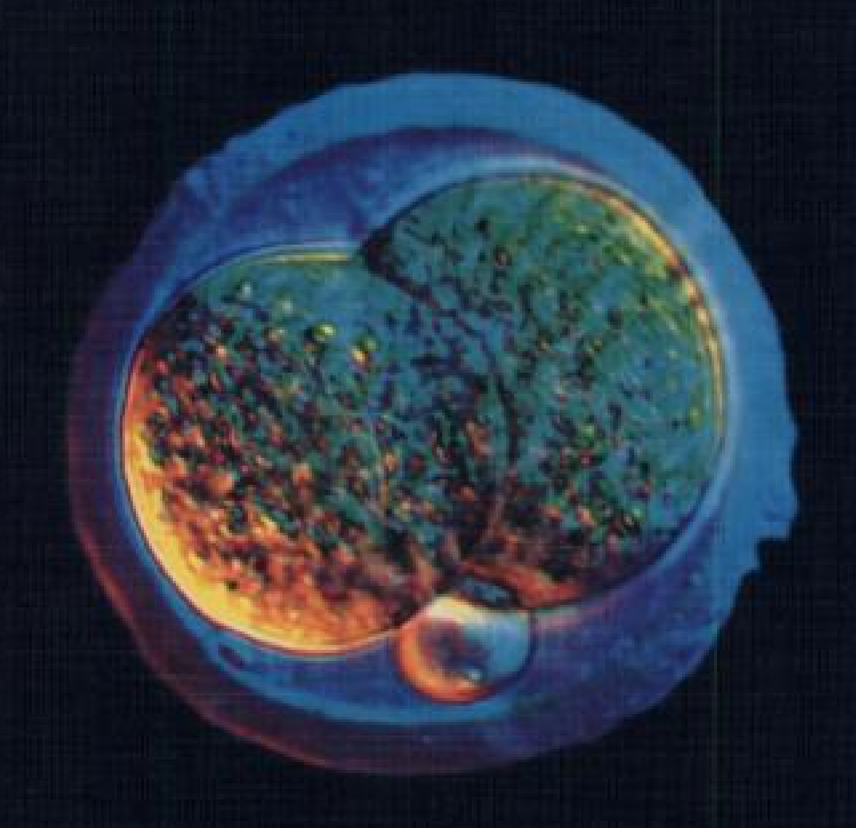
LA CELLULE

UNE APPROCHE MOLÉCULAIRE

• Geoffrey M. COOPER •

Traduction de la 1re édition américaine
par Camille François, avec la collaboration de Jean-Marc François



De Boeck Université

Table des matières

1re PARTIE Introduction

2e PARTIE Flux de l'information génétique

3e PARTIE Structure et fonction cellulaires

4e PARTIE *Régulation cellulaire*

DOMAINES SPÉCIAUX

SYSTÈME IMMUNITAIRE

CELLULE NERVEUSE ET CELLULE MUSCULAIRE

EXPÉRIENCES CLÉ

CAS DE MÉDECINE MOLÉCULAIRE

Préface

J'ai élaboré *La Cellule* pour les étudiants de licence ou pour les étudiants en médecine qui entament l'étude de la biologie cellulaire et moléculaire. En 1991, en concevant le plan de ce texte, je finissais d'écrire mon grand traité *Oncogenes* ainsi qu'un ouvrage général de biologie du cancer destiné aux licences. En élaborant ces textes, je m'aperçus qu'il manquait aux étudiants de licence un ouvrage leur permettant de saisir pas à pas les concepts de la biologie cellulaire moderne. Déjà il existait des traités de biologie cellulaire, réputés pour leur précision, leurs détails et leur caractère exhaustif, mais on sentait le besoin d'une autre sorte d'ouvrage, un que les étudiants de licence aborderaient et maîtriseraient aisément, sans leur voiler la passion qui anime les chercheurs devant les défis de ce domaine révolutionnaire des sciences biologiques.

Dès l'abord, je visais deux objectifs. *La Cellule* devait non seulement être un texte clair, bien structuré, que l'étudiant de licence puisse saisir et maîtriser facilement, mais aussi être satisfaisant au point de vue intellectuel, à la fois en dévoilant les faits expérimentaux et en communiquant la passion de chercher, qui anime nos biologistes moléculaires et cellulaires.

Pour ce faire, il m'a paru que la cohérence du texte réclamait un auteur unique. J'ai donc centré l'ouvrage sur l'aspect moléculaire, où convergent toutes les disciplines biologiques qui se veulent modernes, en ramenant chaque cas particulier traité à un concept plus général ; chaque facette du développement embryonnaire, du système nerveux, du système immunitaire, de la biologie végétale sont commentés dans des contextes plus larges, comme l'expression des gènes, les réarrangements d'ADN, la membrane plasmique, les messageries cellulaires et le cycle cellulaire. Ce plan m'a permis d'imposer à *La Cellule* une taille raisonnable, tout en me donnant loisir d'exposer quelques-uns des domaines les plus fouillés de la biologie contemporaine.

Parmi les percées les plus mémorables de ces dernières années, certaines sont dues au fait que nous connaissons les bases moléculaires et cellulaires de certaines maladies qui frappent l'Homme, nous permettant parfois d'imaginer de nouvelles approches préventives et curatives. Tout au

long de l'ouvrage, on trouvera des exemples de ces rapports entre la biologie cellulaire et des applications médicales, rapports mis en évidence dans chaque chapitre par un encadré intitulé **Médecine moléculaire** ; en insistant sur l'impact croissant que les recherches en biologie moléculaire et cellulaire exercent sur la santé humaine, j'espère attirer l'intérêt du lecteur et répondre à ses questions.

La Cellule ne saurait être un ouvrage parfait au sens étymologique, c'est-à-dire non amendable, car les connaissances sur lesquelles il s'appuie ne sont pas figées ; en effet, cet exposé traite d'un domaine de la biologie en perpétuelle évolution. S'il désire non seulement saisir l'état actuel de nos connaissances, mais encore en évaluer la portée et contribuer aux découvertes futures, l'étudiant devra s'imprégner de l'idée que la biologie moléculaire et cellulaire est par essence une science expérimentale. Si la taille de ce traité nous empêche de présenter les démarches expérimentales dans tous leurs détails, deux stratégies devraient initier le lecteur aux bases expérimentales de la biologie cellulaire contemporaine : d'abord, tout au long de l'ouvrage, j'ai consigné les expériences clé qui ont bouleversé un domaine déterminé ; ensuite, dans chaque chapitre, j'ai inséré une **Expérience clé**, telle qu'elle parut dans la littérature, en reprenant le contexte dans lequel elle fut conçue, dans l'espoir de faire participer le lecteur à la vie d'un chercheur, à l'ambiance qui entoure chaque découverte escomptée.

J'ai enfin tenu à faire part nommément de ce qui est connu et de ce qui ne l'est pas, comme à mettre le doigt sur les sujets controversés, les lacunes dans nos connaissances et les secrets que les chercheurs tentent de dévoiler. Puisse cette approche non seulement transmettre des connaissances scientifiques, mais aussi susciter l'esprit d'émulation et la persévérance nécessaires pour saisir le fonctionnement de la machinerie cellulaire.

Préface à l'édition française

Voici un ouvrage singulièrement adapté aux étudiants en médecine humaine, en médecine vétérinaire, en biologie animale et végétale, en pharmacie, qui maîtrisent déjà les notions de chimie générale et de biologie générale saisies au cours des études secondaires, ou, à défaut, pendant la première candidature scientifique à l'Université.

Délivré des habituelles longues descriptions d'expérience, ce texte concis et très pédagogique expose la somme des fondements de la biologie, toutes disciplines intégrées, en insistant sur la portée des découvertes et en indiquant la limite de leur interprétation.

Si l'auteur se garde d'imposer un historique des découvertes, il laisse cependant percevoir la suite des étapes du développement de nos concepts relatifs au fonctionnement de la matière vivante ; on sent que ce fonctionnement est l'aboutissement de l'ingénieuse et incessante retouche des structures et des mécanismes, retouche à laquelle la cellule a fait appel pour pallier les contraintes réitérées de l'évolution.

La teneur de chaque chapitre est rendue concrète, d'une part, par une «expérience clé» qui fait date dans la mémoire des biologistes moléculaires, d'autre part, grâce à un encadré de «médecine moléculaire» qui expose une découverte typique à grand retentissement sur l'avenir de la médecine : on y trouvera, par exemple, la maladie de Leber, due à un défaut du génome mitochondrial, un type de leucémie causé par une transposition chromosomique, une espèce fréquente de cancer, provoqué par l'expression d'un oncogène.

Les chapitres se terminent par une liste des matières exposées et des termes nouveaux apparus en grasses dans le fil du discours, puis par un questionnaire où l'étudiant trouvera de quoi aiguiser ses connaissances. L'ouvrage s'achève par les réponses au questionnaire, suivies d'un glossaire grâce auquel l'étudiant pourra resserrer et recentrer le cadre de ses concepts en biologie moléculaire.

En remettant à jour la bibliographie, nous avons pris soin d'y introduire une série d'articles en français, en vue de soulager les étudiants francophones qui désirent étendre leurs connaissances et perfectionner leur méthode d'apprentissage.

LISTE DES SUJETS ET PARTICULARITÉS DE

La Cellule

La Cellule est un texte abordable et assimilable , qui permet à l'étudiant de saisir en un semestre l'ensemble des concepts présentés. En élaborant ce texte, j'ai supposé que l'étudiant a suivi un cours de biologie générale et un cours de chimie générale, mais n'a pas encore appris la chimie organique, la biochimie ni la biologie moléculaire. Les matières ont été choisies et arrangées pour que l'étudiant aborde et saisisse facilement les notions exposées.

PLAN DU LIVRE

La Cellule se compose de quatre parties, chacune étant un tout en soi, de sorte que l'enseignant peut aborder les sujets et les approfondir selon le programme de ses différents cours. Vu le large éventail des matières traitées ici, je me sens obligé de présenter maintenant un sommaire de l'ouvrage.

La Ie partie rassemble les chapitres de rappel de notions telles que l'évolution des cellules, les méthodes expérimentales du biologiste, la chimie cellulaire et les bases de la biologie moléculaire moderne. L'étudiant qu'un cours approfondi de biologie générale ou qu'un cours de biologie moléculaire a bien préparé pourra sauter ces chapitres ou s'en servir pour revoir ses connaissances.

La IIe partie se concentre sur la biologie moléculaire de la cellule et comporte des chapitres consacrés à l'organisation des génomes, à la réplication de l'ADN, à sa réparation et à sa recombinaison, à la transcription et à la maturation des ARN ainsi qu'à la synthèse et à la maturation des protéines, puis à la régulation de ces fonctions. L'ordre des chapitres suit le sens dans lequel s'exprime l'information génétique (ADN → ARN → protéine) et offre un exposé synthétique, mais actualisé, de ces notions.

La IIIe partie contient le cœur des notions relatives à la structure et aux fonctions de la cellule ; elle passe en revue le noyau, les organites cytoplasmiques, le cytosquelette et la surface cellulaire. Après avoir décrit le noyau, et appliqué à la cellule eucaryote les notions de biologie moléculai-

re introduites dans la IIe partie, cette IIIe partie porte son intérêt vers l'extérieur du noyau, à savoir, les organites cytoplasmiques et le cytosquelette, pour finir par la membrane plasmique. Ces chapitres forment cependant chacun un tout et on pourra en modifier l'ordre selon les besoins de chaque programme de cours.

La IVe partie enfin s'adresse au domaine passionnant et en pleine révolution qu'est la régulation des fonctions cellulaires, telle que les messageries cellulaires, le cycle cellulaire et la mort cellulaire programmée. Nous terminons par un chapitre sur le cancer, mon propre domaine de recherche, qui synthétise les conséquences des dysfonctionnements des mécanismes de régulation cellulaire.

CARACTÉRISTIQUES DE L'OUVRAGE

Plusieurs éléments pédagogiques ont été introduits à dessein dans *La Cellule* pour que l'étudiant maîtrise et intègre les matières contenues dans cet ouvrage ; en voici les principales caractéristiques :

Arrangement des chapitres Chacun est divisé en quatre ou cinq sections, contenant chacune une ou plusieurs sous-sections ; la liste des sections qui introduit chaque chapitre annonce brièvement son contenu.

Termes clé et *Glossaire* Lors de leur première apparition dans un chapitre, les termes clé sont en caractères gras ; tels on les retrouvera dans le résumé du chapitre ainsi que dans le glossaire placé à la fin de l'ouvrage.

Dessins et microphotographies De nombreux dessins et microphotographies quadrichromes soigneusement choisis illustrent de manière concrète chaque matière exposée.

Expérience clé et *Médecine moléculaire* Chaque chapitre comporte une expérience clé et un sujet de Médecine moléculaire ; on a voulu ainsi donner au lecteur un sens aigu tant de la nature essentiellement expérimentale de la biologie cellulaire et moléculaire que de son épanouissement dans la médecine moderne.

Résumés de chapitres Chaque résumé est un canevas retraçant les sections et sous-sections principales ; ce formatage section par section s'accompagne d'une liste des termes clé introduits dans chacune des sections, donnant un schéma succinct mais complet des notions successivement introduites.

Questionnaires et réponses Grâce au questionnaire fourni à la fin de chaque chapitre (les réponses sont groupées à la fin de l'ouvrage), l'étudiant jugera de chapitre en chapitre s'il a bien compris et assimilé les données et pourra interpréter les résultats expérimentaux.

Bibliographie La vaste liste de références terminant chaque chapitre permet d'accéder à la fois à des revues consacrées à un sujet donné et à un choix de publications originales. La recherche de l'étudiant sera facile parce qu'on a arrangé les articles en suivant les sections de chapitres ; les articles de revue sont agrémentés d'un [R], les articles originaux d'un [O]. Dans la mesure du possible, le traducteur a introduit des références ayant trait à des découvertes importantes publiées jusqu'en novembre 1998. En outre, le traducteur s'est efforcé d'inciter les débutants à lire des travaux plus détaillés : d'une part, en remplaçant les articles anglais par leur traduction quand elle existe, d'autre part en signalant de nombreux titres de traités français modernes ainsi que de références dans des périodiques connus, comme *La Recherche, Pour la Science, Biologie/Médecine.*

Remerciements

Tout traité, quelle que soit sa taille, est la somme des efforts de plusieurs personnes et c'est à la fois un privilège et un plaisir de remercier mes collègues, mes amis et ma famille pour leur contribution à *La Cellule*.

Aux presses ASM, je dois remercier particulièrement Patrick Fitzgerald qui a dirigé ce projet du début à la fin ; notre collaboration durant ces cinq dernières années fut pour moi un plaisir et une illumination ; ses idées ont marqué bien des endroits du plan et des caractéristiques de cet ouvrage.

Un ouvrage couvrant la plupart des domaines de la biologie cellulaire étant hors de la portée d'un seul biologiste, j'ai demandé la collaboration de septante et un collègues qui sont des experts dans un domaine de recherche et qui ont lu et jugé les premiers jets des chapitres de *La Cellule*, en y consacrant sans compter leur temps et leur compétence. Je les remercie vivement de leurs efforts et de leurs avis. Parmi eux, je dois beaucoup à Thomas Roberts (Florida State University) et à Roger Sloboda (Dartmouth College), pour avoir lu et communiqué leur appréciation générale sur presque tous les sujets de l'ouvrage, non seulement en tant qu'experts, mais aussi en tant qu'enseignants actifs et passionnés. Je remercie également Brian Storrie (Virginia Tech) de son aide, de ses vues à long terme et de ses conseils pendant la mise en forme de ce projet. Enfin, je sais gré aux efforts de Yale Altman et de Karen Jones, de ASM Press, d'avoir obtenu et arrangé les nombreuses revues si indispensables à l'élaboration de cet ouvrage.

La mise en œuvre de *La Cellule* est due principalement à Andy Sinauer et à ses collaborateurs de Sinauer Associates ; au cours de notre heureuse collaboration, ce fut un plaisir d'apprécier leur efficacité et leur professionalisme. Andy a lui-même surveillé les moindres détails de l'entreprise du début à la fin. Dean Scudder donna son avis autorisé sur divers points, Caroll Wigg coordonna habilement toutes les étapes compliquées de la mise en forme et de l'insertion des figures dans le texte, Jane Potter réussit à merveille sa collecte des nombreuses microphotographies illustrant l'ouvrage et Christopher Small assembla les diverses parties du volume dans son état final. Les dessins sont l'œuvre de John Woolsey et Patrick Lane du

bureau d'illustration J/B Woolsey. Les illustrations sont en effet une partie cruciale de l'ouvrage ; John et Patrick réussirent merveilleusement à produire un ensemble d'illustrations basées sur mes croquis rudimentaires. Je remercie aussi Susan Schmidler d'avoir composé les pages intérieures et la couverture de *La Cellule*.

Si les auteurs ont l'habitude de remercier les membres de leur famille pour la patience manifestée durant les longues heures mises à rédiger un livre, c'est un immense plaisir pour moi de le faire aussi, d'autant plus que ma famille a joué un rôle plus actif encore dans l'élaboration de *La Cellule*. Chacun de nous s'est en effet engagé du début à la fin. Ann, mon épouse, elle aussi une biologiste cellulaire, lut et corrigea les maintes versions du manuscrit. La charge des recherches bibliographiques, du choix et de la transcription des nombreuses publications citées incomba à Gwen et Ryan. Vers la fin de l'entreprise, Allison aida à collationner les nombreux chapitres de l'ouvrage à travers les heurts précédant l'échéance de la mise sous presse. L'important glossaire terminant l'ouvrage fut composé par Rachel, qui y appliqua l'expérience de son tout récent graduat en biologie.

Conseillers

Gerald M. Adair
M. D. Anderson Center
University of Texas

Ibrahim Ades
University of Maryland, College Park

Ronald Berezney
State University of New York at Buffalo

Niels Bols
University of Waterloo
Ontario, Canada

Joan S. Brugge
ARIAD Pharmaceuticals, Inc.
Alberta, Canada

Brian Burke
The University of Calgary
Alberta, Canada

David A. Clayton
Stanford University School of Medicine

Roger I. Davis
Howard Hughes Medical Institute
University of Massachusetts Medical Center

Michael Edidin
Johns Hopkins University

Gary Felsenfeld
National Institutes of Health
Bethesda, MD

Michael Forman
Purdue University

Errol C. Friedberg
University of Texas Southwestern Medical Center

David Fromson
California State University, Fullerton

Larry Gerace
Scripps Research Institute
La Jolla, CA

Reid Gilmore
University of Massachusetts Medical Center

Dennis Goode
University of Maryland

Michael M. Gottesman
National Cancer Institute
National Institutes of Health

Michael E. Greenberg
Children's Hospital
Harvard Medical School

Barry Gumbiner
Memorial Sloan-Kettering Cancer Center

Alan Hall
MRC Laboratory for Molecular Cell Biology
University College London

Joyce L. Hamlin
University of Virginia, Charlottesville

Ulla Hansen
Dana-Farber Cancer Institute
Harvard Medical School

F. Ulrich Hartl
Howard Hughes Medical Institute
Memorial Sloan-Kettering Cancer Center

Lawrence Hightower
University of Connecticut, Storrs

Tony Hunter
Salk Institute, La Jolla, CA

James N. Ihle
St. Jude's Children's Research Hospital
Memphis, TN

Judith A. Jaehning
Indiana University, Bloomington

Haig H. Kazazian, Jr.
University of Pennsylvania

Kenneth Keegstra
MSU-DOE Plant Research Laboratory
Michigan State University

Robert A. Koch
California State University, Fullerton

Elaine Lai
Brandeis University

Jerry B. Lingrel
University of Cincinnati Medical Center

Elizabeth J. Luna
Worcester Foundation for Experimental Biology, Shrewsbury, MA

Carolyn Machamer
Johns Hopkins University School of Medicine

Umadas Maitra
Albert Einstein College of Medicine

Russel Malmberg
University of Georgia, Athens

James Manley
Columbia University

J. Richard McIntosh
University of Colorado, Boulder

Donald Miles
University of Missouri, Columbia

David A. Mullin
Tulane University

Eva Neer
Harvard Medical School

Carol S. Newlon
UMDNJ/New Jersey Medical school

John Newport
University of California, San Diego

Danton O'Day
University of Toronto, Erindale Campus

Donata Oertel
University of Wisconsin, Madison

Barbara Pearse
MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, UK

Hugh Pelham
Medical Research Council, Cambridge, UK

Jonathon Pines
The Welcome Cancer Research Center, Cambridge, UK

T. A. Rapoport
Max-Delbrück-Centrum
Berlin, Germany

Marilyn D. Resh
Memorial Sloane-Kettering Cancer Center

Joel D. Richter
Worcester Foundation for Biomedical Research, Shrewsbury, MA

David A. Rintoul
Kansas State University, Manhattan

Thomas M. Roberts
Florida State University, Tallahassee

Alan Sachs
University of California, Berkeley

Shelley Sazer
Baylor College of Medicine

Gottfried Schatz
University of Basel, CH

Randy Schekman
University of California, Berkeley

Tom Shrader
Albert Einstein College of Medicine

David Schlessinger
Washington University, St. Louis

Kai Simons
European Molecular Biology Laboratory
Heidelberg, D

Roger Sloboda
Dartmouth College

Timothy A. Springer
Harvard Medical School

Joseph M. Steffen
University of Louisville

Thomas P. Stossel
Brigham and Women's Hospital
Harvard Medical School

Suresh Subramani
University of California, San Diego

John Taylor
Wayne State University

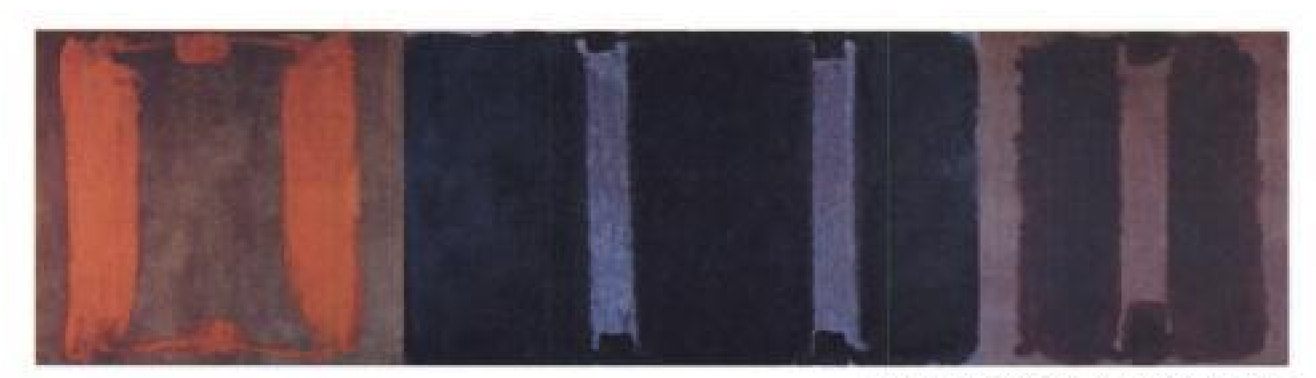
Patricia Wadsworth
University of Massachusetts, Amherst

Jonathan R. Warner
Albert Einstein College of Medicine

Larry G. Williams
Kansas State University, Manhattan

Fred Wilt
University of California, Berkeley

Debra J. Wolgemuth
Columbia University



Mark Rothko, *Mural for Holyoke Center*, 1961

1re PARTIE *Introduction*

1 *Constitution de la cellule et recherche en biologie : survol*

2 *La cellule en tant que laboratoire de chimie*

3 *Fondements de la biologie moléculaire*

1

Constitution de la cellule et recherche en biologie : survol

La biologie moléculaire de la cellule, un domaine de recherche en pleine effervescence, est la clé de voûte de toutes les sciences biologiques. C'est vrai non seulement du point de vue des connaissances de base, mais aussi en considération du nombre croissant d'applications en agriculture, en biotechnologie et en médecine. Ainsi, du fait qu'on connaît de mieux en mieux les bases moléculaire et cellulaire de maintes maladies humaines, les médecins ont renouvelé leur manière d'en approcher la prévention et le traitement.

Comme la biologie cellulaire et moléculaire est un domaine de recherche en pleine expansion, ce chapitre va décrire les méthodes d'étude de la cellule et revoir quelques-uns de ses traits fondamentaux. Les biologistes tirent grand profit à confronter les ressemblances et les différences entre les diverses variétés de cellules ; c'est pourquoi la première section de ce chapitre est consacrée à ce qui unit et distingue les cellules contemporaines quant à leur évolution à partir d'un ancêtre commun. D'une part, toutes les cellules ont en commun des traits fondamentaux qu'elles ont préservés tout au long de l'évolution, notamment ceux-ci : toute cellule utilise l'ADN comme matériau génétique, elle est bordée par une membrane plasmique et elle met en jeu des mécanismes généraux pour trouver l'énergie dont elle a besoin. D'autre part, les cellules contemporaines témoignent d'une grande diversité de mode de vie. Beaucoup, comme les bactéries, les amibes ou les levures ne forment pas d'associations, ce sont des organismes monocellulaires qui se répliquent de leur propre gré. Les organismes plus complexes sont des ensembles de cellules qui fonctionnent de manière concertée et dont certains membres se sont spécialisés pour remplir des tâches particulières. Le corps humain, par exemple, se compose de plus de 200 types de cellules, chacune chargée d'une tâche particulière, par exemple la mémoire, la vue, le mouvement, la digestion. La diversité dont témoigne chaque type cellulaire est étonnante : pour s'en convaincre, il suffit de comparer une bactérie à un neurone du cerveau humain.

La ressemblance profonde entre les divers types cellulaires a permis de tisser une trame unificatrice à la biologie cellulaire, au point qu'on ose extrapoler et généraliser aux autres types cellulaires les principes de base tirés d'expériences sur un seul type de cellule. Pour examiner les divers aspects

de la biologie cellulaire et moléculaire, on dispose de tout une série de cellules et d'organismes ; la seconde section de ce chapitre présente certaines propriétés de cellules qui servent de modèles particulièrement fertiles pour l'expérimentateur. Notons enfin que les progrès de la biologie cellulaire dépendent étroitement de la qualité des outils expérimentaux qui permettent au biologiste de faire de nouvelles observations ou d'imaginer de nouvelles expériences. Pour clore ce chapitre d'introduction, on exposera certaines des approches expérimentales choisies par le biologiste cellulaire et on passera en revue les principales percées historiques qui ont forgé nos connaissances sur la structure et le fonctionnement de la cellule.

ORIGINE ET ÉVOLUTION DES CELLULES

On reconnaît deux classes principales de cellules, selon qu'on y décèle ou non un noyau. Les cellules de **procaryotes** (bactéries) ne possèdent pas d'enveloppe nucléaire, tandis que les cellules d'**eucaryotes** possède un noyau dans lequel le matériau génétique n'est pas en contact avec le cytoplasme. En général, la cellule procaryotique est plus petite et plus simple que la cellule eucaryotique et, outre qu'elle est dépourvue de noyau, son génome est moins complexe et son cytoplasme ne possède ni organite ni cytosquelette (tableau 1.1). Malgré ces différences, comme la vie des procaryotes et des eucaryotes dépend des mêmes mécanismes moléculaires fondamentaux, on admet que les cellules contemporaines descendent toutes d'un ancêtre primordial unique. Comment s'est constituée cette première cellule ? Et d'où proviennent la complexité et la diversité des cellules de notre biosphère ?

La cellule primordiale

Il semble que l'origine de la vie remonte à une époque située entre 3,8 et 3,5 milliards d'années, à peu près un milliard d'années après la formation de la Terre (figure 1.1). On situe l'origine de la vie dans une étroite période (dans le sens évolutionniste) du fait qu'on a trouvé des fossiles sensés correspondre à des cellules dans des couches géologiques datant de 3,5 milliards d'années et que, avant 3,8 milliards d'années, la croûte terrestre primitive était trop hostile pour permettre la survie d'une cellule. On se perd en conjectures quant à l'origine de la vie et de la formation de la première cellule, car on ne peut pas reproduire ces événements au laboratoire. Certains types d'expériences donnent cependant quelque idée sur certaines étapes de ce processus.

Dès 1920, on suggéra que des molécules organiques simples pouvaient se former et polymériser spontanément en macromolécules dans un milieu en équilibre avec l'atmosphère de la Terre primitive. À la naissance de la vie, on pense que cette atmosphère ne contenait que des traces d'oxygène, mais était riche en CO_2 et N_2, à côté de gaz comme H_2, H_2S et CO ; c'était une atmosphère réductrice, dans laquelle des molécules organiques se for-

Tableau 1.1 Cellules de procaryotes et d'eucaryotes

Caractère	Procaryotes	Eucaryotes
Noyau	Absent	Présent
Diamètre de la cellule type	~ 1 µm	10-100 µm
Cytosquelette	Absent	Présent
Organites cytoplasmiques	Absents	Présents
Contenu en ADN (pb)	1×10^6 à 5×10^6	$1,5 \times 10^7$ à 5×10^9
Chromosomes	Molécule d'ADN unique refermée	Plusieurs molécules d'ADN ouvertes

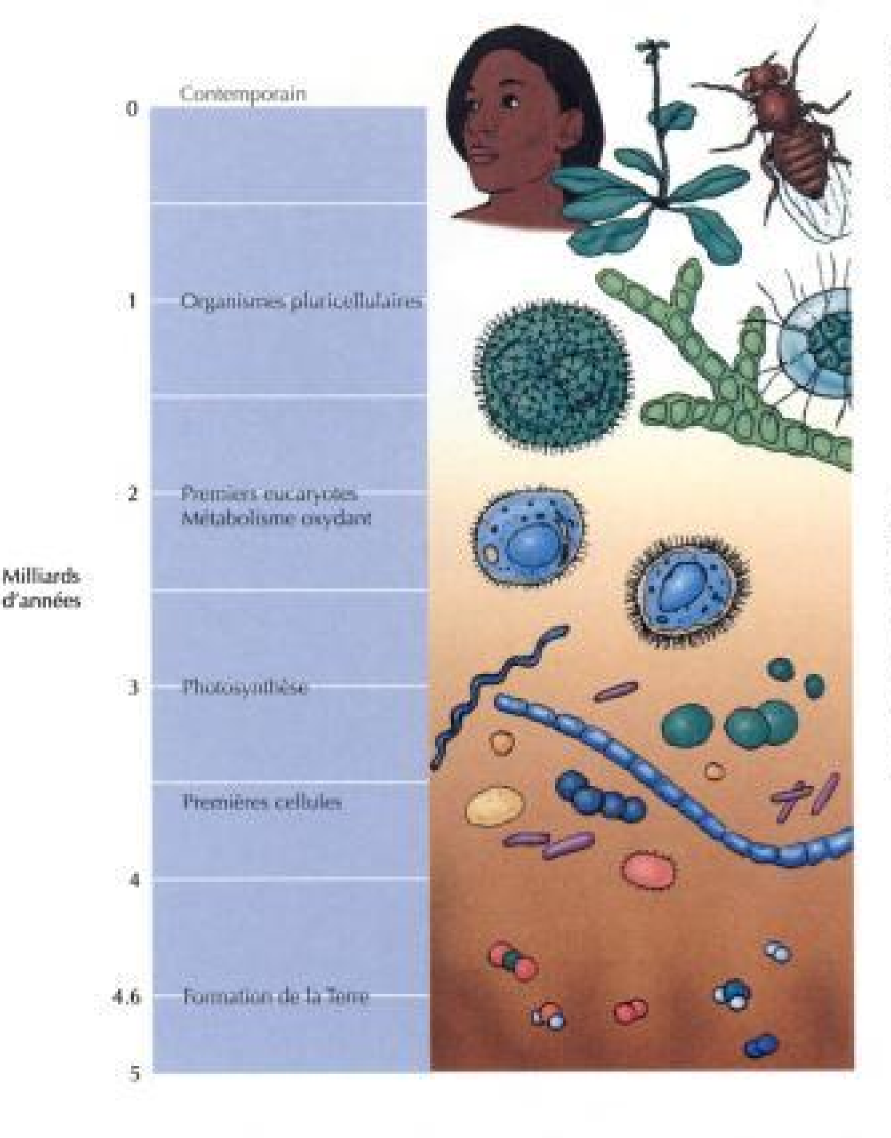


Figure 1.1
Chronologie de l'évolution du vivant. L'échelle indique l'époque approximative à laquelle on pense que se sont produits les grands moments de l'évolution du monde vivant.

Figure 1.2
Formation spontanée de molécules organiques. On fait passer de la vapeur d'eau dans une atmosphère contenant CH_4, NH_3 et H_2 et on envoie une décharge électrique. L'analyse du milieu réactionnel révèle la formation de diverses molécules organiques, dont des acides aminés comme l'alanine, l'aspartate, le glutamate et la glycine.

Électrode
CH_4
NH_3
H_2O
H_2O
H_2 CH_4
H_2 NH_3
Décharge électrique
Refroidisseur
Eau
Chaleur
Molécules organiques
Alanine
Aspartate
Glutamate
Glycine
Urée
Lactate
Acétate
Formiate

maient spontanément en présence d'une source d'énergie comme le soleil ou une décharge électrique. En 1950, Stanley Miller (à ce moment, étudiant en licence) démontra expérimentalement pour la première fois la formation spontanée de molécules organiques, notamment de plusieurs acides aminés, quand il faisait passer une décharge électrique dans un mélange de H_2, CH_4 et NH_3 en présence d'eau (figure 1.2). Bien que les expériences de Miller n'aient pas reproduit exactement les conditions régnant sur la Terre primitive, elles montraient tout de même la possibilité d'une synthèse spontanée de molécules organiques, les modules de base dont serait constitué l'organisme vivant primordial.

L'évolution se poursuivit par l'apparition des macromolécules. On a montré que les monomères modulaires constituant les macromolécules se polymérisaient spontanément dans des conditions prébiotiques acceptables. Si, par exemple, on chauffe à sec un mélange de divers acides aminés, on observe que ceux-ci polymérisent en polypeptides, mais une macromolécule donnant naissance au vivant se particularise par le fait qu'elle doit, pour se perpétuer en évoluant, pouvoir diriger la synthèse d'autres exemplaires d'elle-même.

Parmi les principales sortes de macromolécules porteuses d'information que possède la cellule contemporaine (acides nucléiques et protéines), seuls

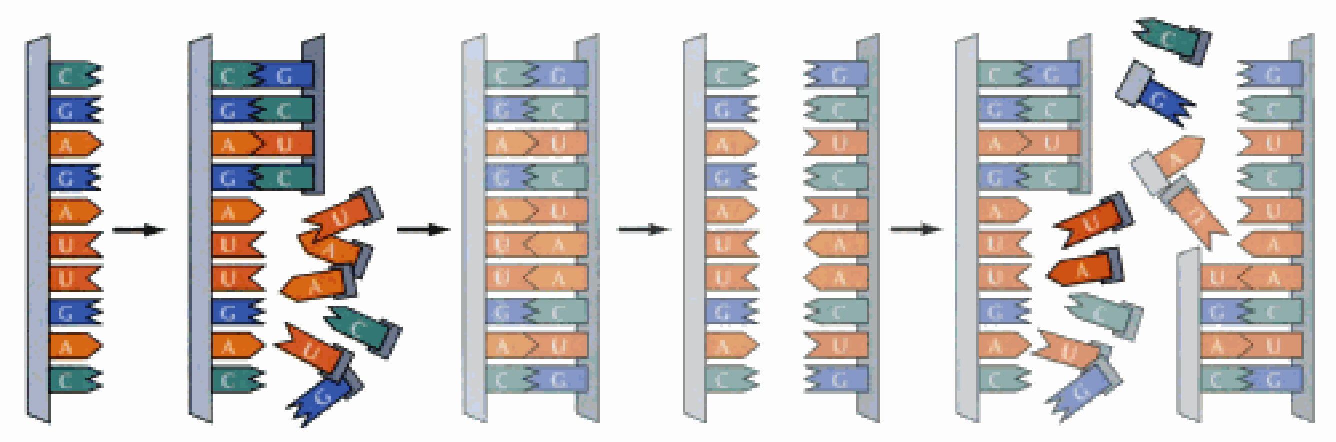


Figure 1.3
Autoréplication d'un ARN.
Par appariement complémentaire entre nucléotides [adénine (A) avec uracile (U) et guanine (G) avec cytosine (C)], un brin d'ARN sert de matrice pour la synthèse d'un brin nouveau ayant la séquence complémentaire du brin originel.

les acides nucléiques sont doués d'autoréplication. Ils servent de matrice à leur propre synthèse, de par l'appariement de bases entre nucléotides complémentaires (figure 1.3). Un pas crucial dans la saisie de l'évolution moléculaire fut franchi au début des années '80, quand les laboratoires de Sid Altman et Tom Cech montrèrent que l'ARN catalyse certaines réactions chimiques, notamment la polymérisation des nucléotides. Seul l'ARN est donc capable de servir à la fois de matrice pour sa propre réplication et de catalyseur de cette réplication. De là vient l'idée couramment admise que l'ARN fut le matériau génétique primordial : la période primitive de l'évolution chimique aurait joué sur ce système de molécules d'ARN douées d'autoréplication, d'où son appellation de **monde de l'ARN**. Des interactions successives entre l'ARN et les protéines auraient abouti au code génétique tel que nous le connaissons, puis l'ADN aurait pris la place de l'ARN en tant que matériau génétique. On estime que la première cellule s'est formée par enclavement d'un ARN autoréplicatif dans une sphère membraneuse composées de **phospholipides** (figure 1.4). Nous verrons en détail au chapitre suivant que les phospholipides sont les éléments primordiaux des membranes biologiques contemporaines, notamment de la membrane plasmique des cellules de procaryotes et d'eucaryotes. Le trait principal des phospholipides qui composent les membranes est qu'ils sont des molécules **amphipathiques**, c'est-à-dire qu'une partie de la molécule est soluble dans l'eau et que l'autre y est insoluble. Un phospholipide comporte une longue chaîne aliphatique insoluble dans l'eau (**hydrophobe**) unie à un groupe polaire phosphorylé soluble dans l'eau (**hydrophile**). Qu'on les disperse

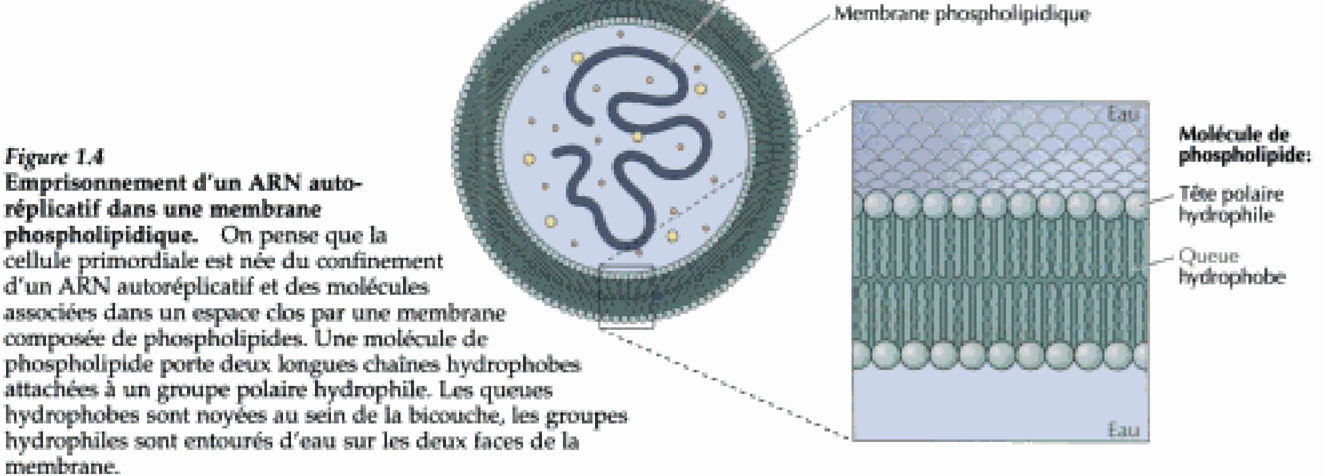


Figure 1.4
Emprisonnement d'un ARN autoréplicatif dans une membrane phospholipidique. On pense que la cellule primordiale est née du confinement d'un ARN autoréplicatif et des molécules associées dans un espace clos par une membrane composée de phospholipides. Une molécule de phospholipide porte deux longues chaînes hydrophobes attachées à un groupe polaire hydrophile. Les queues hydrophobes sont noyées au sein de la bicouche, les groupes hydrophiles sont entourés d'eau sur les deux faces de la membrane.

dans l'eau, les phospholipides s'agrègent spontanément sous forme de bicouche, avec leur groupe polaire phosphorylé tourné vers l'extérieur dans le milieu aqueux, et leurs queues hydrocarbonées collées à celles des molécules voisines au cœur de l'agrégat. Ce genre de membrane phospholipidique est une barrière stable entre deux compartiments aqueux, par exemple entre l'intérieur de la cellule et le milieu environnant.

En confinant un ARN autoréplicatif et les molécules associées à l'intérieur d'un compartiment cerné par une membrane phospholipidique, l'évolution aurait engendré une unité physique capable d'autoréplication et d'évolution ultérieure. S'il existait déjà à cette époque une synthèse protéique dirigée par l'ARN, la cellule primordiale aurait comporté un ARN autoréplicatif accompagné des protéines dont il tenait le code.

Évolution du métabolisme

Nées d'une mer de molécules organiques, les cellules puisaient directement leurs aliments et leur énergie dans l'environnement, une situation cependant si précaire que les cellules furent forcées de trouver des mécanismes propres pour obtenir de l'énergie et former les molécules nécessaires à la réplication cellulaire. La production d'énergie métabolique et son utilisation parcimonieuse soutiennent toutes les activités cellulaires et on retrouve les voies principales du métabolisme énergétique (développé au chapitre 2) à peine modifiées dans les cellules contemporaines. Toutes les cellules utilisent le triphosphate 5' d'adénosine (ATP) comme source d'énergie dans la synthèse des composants cellulaires et dans l'activation coûteuse en énergie de processus comme la motilité (par exemple, la contraction musculaire). Il semble que les cellules ont élaboré leurs mécanismes fournisseurs d'énergie en trois étapes, l'une correspondant à la glycolyse, la deuxième à la photosynthèse, la troisième à l'oxydation phosphorylante (figure 1.5). Le passage de l'une à l'autre de ces étapes a modifié l'atmosphère terrestre, forçant, de ce fait, l'évolution à changer son cours.

Dans la période anaérobie originelle de l'atmosphère terrestre, les premières réactions livrant de l'énergie libre effectuaient, semble-t-il, la dégradation des molécules organiques en l'absence d'oxygène ; on pense que ces réactions ressemblaient quelque peu à la **glycolyse** contemporaine, à savoir une dégradation du glucose en acide lactique, avec gain net de deux molécules d'ATP. Si elles utilisent l'ATP comme source d'énergie chimique intracellulaire, toutes les cellules contemporaines* effectuent la glycolyse, en accord avec la thèse selon laquelle ces réactions ont apparu très tôt dans l'évolution.

La glycolyse est une voie qui convertit l'énergie des molécules organiques préformées en ATP, dont l'énergie libre peut servir à entraîner

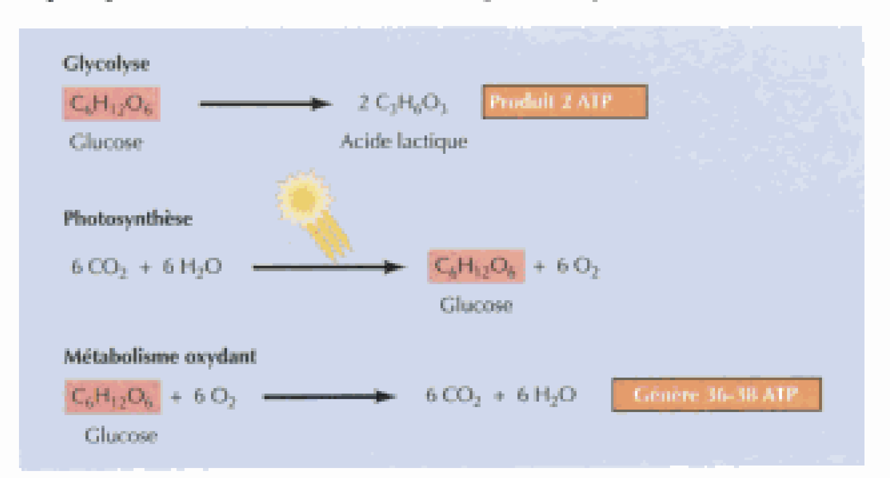


Figure 1.5
Source de l'énergie métabolique. La glycolyse consiste en une scission anaérobie du glucose en acide lactique. La photosynthèse capte l'énergie solaire pour soutenir une synthèse de glucose à partir de CO_2 et H_2O, en libérant O_2 comme sous-produit. Cet O_2 issu de la photosynthèse entre comme oxydant dans le catabolisme du glucose en CO_2 et H_2O, voie qui produit beaucoup plus d'énergie que la voie glycolytique.

* *NdT*: (sauf peut-être *Archaeoglobus*, p. 174)

d'autres réactions métaboliques. On pense que l'étape suivante de l'évolution fut la **photosynthèse**, grâce à laquelle la cellule capte l'énergie solaire et se libère ainsi d'une dépendance à l'égard des molécules organiques préformées dans son environnement. La première bactérie photosynthétique, apparue voilà 3 milliards d'années, utilisait probablement H_2S pour transformer CO_2 en molécules organiques ; cette voie photosynthétique est encore en usage chez certaines bactéries. C'est plus tard que H_2O servit de donneur d'électrons et d'hydrogène dans la conversion de CO_2 en molécules organiques, avec production de O_2 comme sous-produit de la photosynthèse ; à partir de ce moment, l'oxygène s'est accumulé jusqu'au niveau élevé actuel, atteint voilà environ 2 milliards d'années.

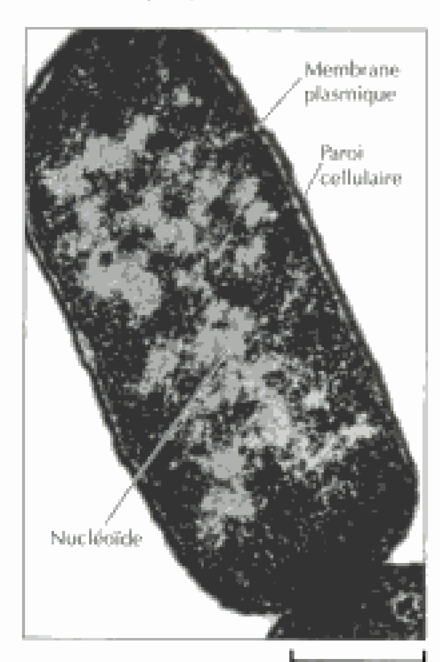
La libération de O_2 par la photosynthèse modifia la biosphère et l'évolution des cellules aboutit, selon l'idée reçue, au **métabolisme oxydatif**. Selon une autre opinion, celui-ci aurait précédé la photosynthèse, qui, en augmentant suffisamment le taux d'O_2 atmosphérique, aurait favorisé la sélection d'organismes capables d'utiliser O_2 dans leurs réactions métaboliques donneuses d'énergie. Dans chaque cas, O_2 est une molécule très réactionnelle et le métabolisme oxydant, basé sur cette réactivité, a mis à la disposition de la cellule un mécanisme fournisseur d'énergie, puisée dans les molécules organiques, bien plus efficace que n'était la glycolyse anaérobie. La décomposition d'une molécule de glucose en CO_2 et H_2O, par exemple, produit une énergie libre allant de 36 à 38 molécules d'ATP, alors que la glycolyse anaérobie ne récupère que 2 molécules d'ATP par molécule de glucose. À quelques exceptions près, les cellules que nous côtoyons utilisent les réactions d'oxydation comme source principale d'énergie.

Les procaryotes contemporains

On divise les procaryotes contemporains, qui incluent tous les types de bactéries, en deux groupes, les **archaebactéries** et les **eubactéries**, qui ont divergé au début de l'évolution. Certaines archaebactéries occupent des milieux très hostiles, inhabituels à notre époque, mais qui prévalaient dans la biosphère primitive ; les thermoacidophiles, par exemple, habitent les sources sulfureuses chaudes dont la température atteint parfois 80 °C et l'acidité un pH de 2. Les eubactéries comprennent les formes communes des bactéries contemporaines — un vaste groupe d'organismes occupant tous les milieux, dont le sol, l'eau et d'autres organismes (comme les pathogènes de l'Homme).

La bactérie type est sphérique, en bâtonnet ou en vrille ; son diamètre va de 1 à 10 µm. Son ADN comprend 0,6 à 5 millions de paires de bases, une quantité suffisante pour coder environ 5 000 protéines différentes. Les procaryotes les plus grands et les plus complexes sont les **cyanobactéries**, chez qui est apparue la photosynthèse.

Figure 1.6
Micrographie électronique de E. coli. La cellule est entourée de la paroi cellulaire, appliquée à la membrane plasmique. L'ADN siège dans le nucléoïde. (Biology Media/Photo Researchers, Inc).



La cellule procaryotique classique est illustrée par *Escherichia coli* (*E. coli*), un habitant courant de la flore intestinale humaine (figure 1.6). C'est une cellule cylindrique, d'environ 1 µm de diamètre sur 2 µm de long. Comme la plupart des autres procaryotes, *E. coli* est entouré d'une paroi cellulaire rigide, faite d'une trame polysaccharidique et protéique sur laquelle s'appuie la membrane plasmique, une bicouche de phospholipides associés à des protéines. Si la paroi cellulaire est poreuse et perméable à toute une série de molécules, la membrane plasmique est par contre une vraie barrière fonctionnelle entre le cytoplasme cellulaire et le milieu environnant. L'ADN de *E. coli* consiste en un nucléoïde contenant une molécule unique refermée sur elle-même, qui, contrairement au noyau des eucaryotes, n'est pas entourée d'une membrane la séparant du cytoplasme. Le cytoplasme renferme près de 30 000 **ribosomes** (sites de la synthèse protéique), qui lui donnent un aspect granuleux.

La cellule eucaryotique

Comme la cellule procaryotique, la cellule eucaryotique est bordée d'une membrane plasmique et contient des ribosomes,, mais elle est beaucoup plus complexe car elle contient aussi un noyau, toute une série d'organites cytoplasmiques ainsi qu'un cytosquelette (figure 1.7). Le principal organite, bien visible, de la cellule d'eucaryote est son **noyau**, d'un diamètre d'environ 5 µm ; il contient l'information génétique de la cellule, qui prend la forme, chez les eucaryotes, d'une série de molécules d'ADN non refermées sur elles-mêmes. Dans le noyau, l'ADN se réplique et est transcrit en ARN ; celui-ci est traduit en protéines au sein des ribosomes dans le cytoplasme.

En dehors du noyau, le cytoplasme de la cellule d'eucaryote contient une série d'organites bordés d'une membrane, chacun doué d'une activité métabolique propre. La cellule d'eucaryote est en général beaucoup plus volumineuse, jusqu'à mille fois plus, que la cellule de procaryote. L'efficacité métabolique des cellules eucaryotiques est due à ce que le cytoplasme est réparti entre organites et cytosol. Deux de ces organites, la **mitochondrie** et le **chloroplaste** jouent un rôle crucial dans la fourniture d'énergie. La mitochondrie, présente dans presque toutes les cellules d'eucaryotes, est le siège du métabolisme oxydant et produit la majeure partie de l'ATP issu de l'énergie récupérée de la dégradation des molécules organiques. Le chloroplaste effectue la photosynthèse ; on le trouve dans les cellules de plantes et d'algues vertes. Le **lysosome** et le **peroxysome** sont des compartiments métaboliques destinés respectivement à la destruction de certaines macromolécules et à diverses réactions d'oxydation. En outre, la plupart des cellules végétales contiennent de grandes **vacuoles**, qui jouent plusieurs rôles, notamment la digestion de macromolécules et la mise en réserve aussi bien de déchets que de matières nutritives.

Vu la grande taille et la complexité des cellules d'eucaryote, la mise en place des protéines néosynthétisées y représente une tâche énorme. Deux organites cytoplasmiques, le **réticulum endoplasmique** et l'**appareil de Golgi** sont spécialisés dans le tri et le transport des protéines de sécrétion et des protéines qui seront incorporées dans la membrane plasmique et dans le lysosome. Le réticulum endoplasmique est un réseau appuyé sur l'enveloppe nucléaire et occupant tout le cytoplasme ; outre son rôle dans la maturation et le transport des protéines, il effectue la synthèse des lipides. Incluses dans de petites vésicules bordées de membrane, les protéines passent du réticulum endoplasmique à l'appareil de Golgi, qui achève leur maturation et leur tri, avant de les guider vers leur emplacement final. Outre ce rôle dans le transport des protéines, l'appareil de Golgi est aussi un site de synthèse lipidique et, chez les plantes, le site de synthèse de certains polysaccharides qui formeront la paroi cellulaire.

Les cellules d'eucaryote sont structurées aussi à un autre niveau, par leur cytosquelette, qui est un réseau de filaments protéiques tendu à travers le cytoplasme ; ce cytosquelette, l'échafaudage de la cellule, lui impose sa forme et soutient son cytoplasme ; il garantit aussi les déplacements de la cellule dans son ensemble (par exemple, la contraction du myocyte) ainsi que le transport et la mise en place des organites et autres structures, notamment la migration des chromosomes au moment de la mitose.

Les eucaryotes apparurent voilà 2 milliards d'années, après 1,5 milliards d'années d'évolution des procaryotes. Le séquençage des ADN nous apprend que les archaebactéries diffèrent autant des eubactéries que chacune de celles-ci diffère des eucaryotes contemporains. Aussi un événement très précoce de l'évolution aurait-il été la divergence, à partir d'un ancêtre commun, de trois branches fondatrices, celle des archaebactéries, celle des eubactéries et celle des eucaryotes contemporains (figure 1.8). Une étape clé de l'évolution des eucaryotes fut l'acquisition d'organites subcellulaires bordés de membrane, qui ont rendu ces cellules particulièrement

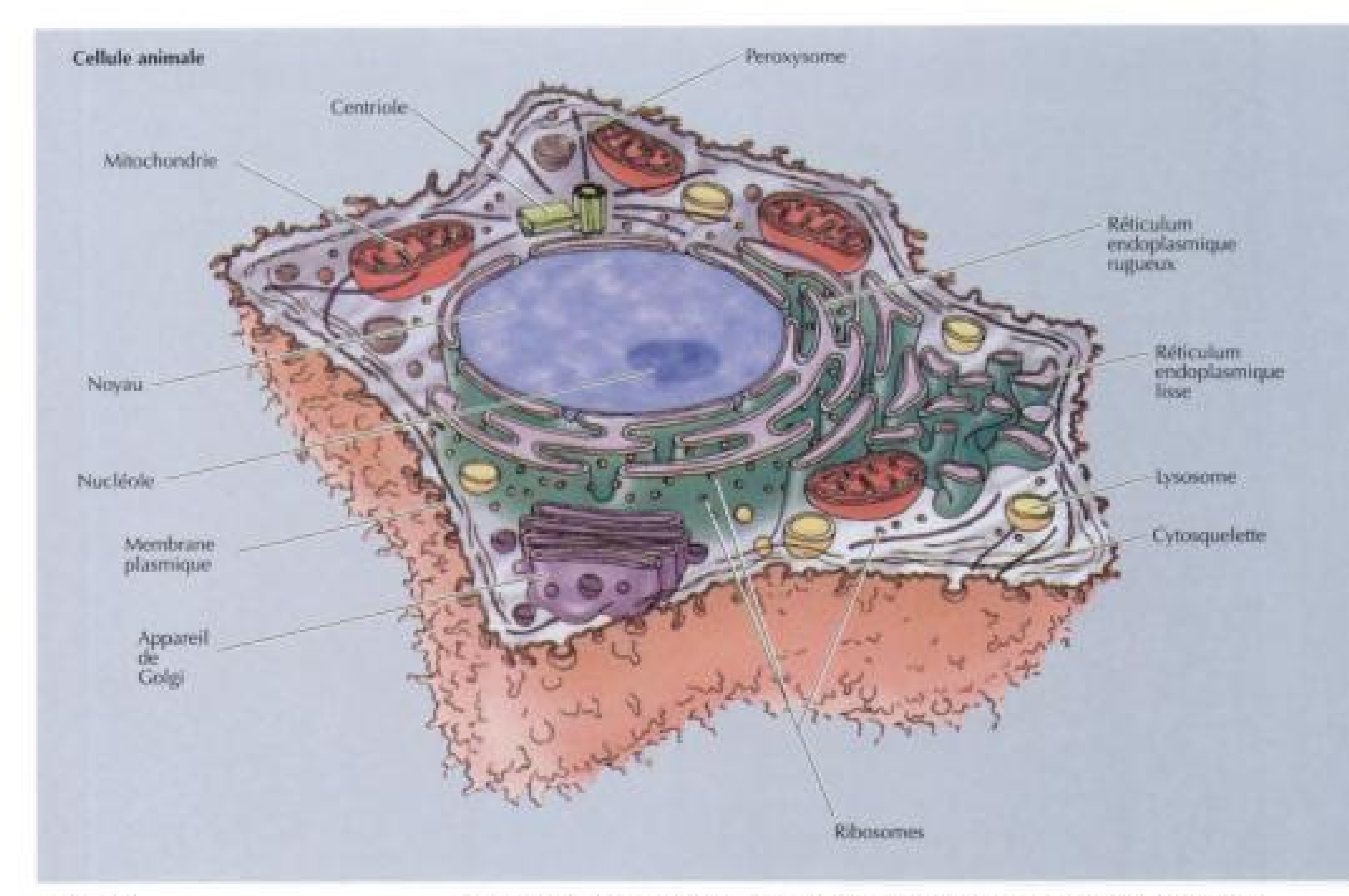


Figure 1.7
Structure de la cellule animale et de la cellule végétale. Les cellules animales et végétales sont bordées par une membrane plasmique et contiennent toutes un noyau, un cytosquelette et de nombreux organites cytoplasmiques. Les cellules végétales possèdent en plus une paroi cellulaire, des chloroplastes et de grandes vacuoles.

complexes. On pense que les organites proviennent de cellules procaryotiques qui sont allées se nicher dans un ancêtre des eucaryotes.

Le postulat selon lequel la cellule eucaryote provient d'une association symbiotique à des procaryotes — une **endosymbiose** — est bien attesté par l'étude des mitochondries et des chloroplastes, issus, semble-t-il, de bactéries ayant colonisé de grandes cellules : ces deux organites ont la taille des bactéries et se reproduisent en se clivant en deux, comme les bactéries. Un argument encore plus convainquant est le fait que mitochondries et chloroplastes possèdent leur propre ADN, qui code certains de leurs composants. Les ADN mitochondriaux et chloroplastiques se répliquent à chaque division de l'organite, les gènes codés sont transcrits dans l'organite et traduits par les ribosomes de l'organite. Mitochondries et chloroplastes comportent donc leur propre système génétique, distinct du génome nucléaire de la cellule. En outre, les ribosomes et les ARN ribosomiaux de ces organites ressemblent plus à ceux des bactéries qu'à ceux codés par le génome nucléaire des eucaryotes.

Les biologistes conviennent que ces organites ont une origine endosymbiotique : la mitochondrie serait issue d'une bactérie aérobie, le chloroplaste proviendrait d'une bactérie photosynthétique du genre cyanobactérie. En accaparant une bactérie aérobie, la cellule anaérobie accédait au métabolisme oxydant, en acquérant une bactérie photosynthétique, elle gagnait, grâce à la photosynthèse, une indépendance nutritionnelle. Étant à l'avantage des deux partenaires, ces associations symbiotiques furent sélectionnées au cours de l'évolution. Petit à petit, la plupart des gènes apportés par ces bactéries furent, semble-t-il, transférés au génome nucléaire de la cellule, de telle sorte qu'il n'en subsiste qu'une minorité dans le génome des organites.

Figure 1.8
Évolution des cellules. Les cellules contemporaines sont issues d'un ancêtre procaryotique commun via trois lignées ancestrales, qui ont donné les archaebactéries, les eubactéries et les eucaryotes. Mitochondries et chloroplastes proviennent respectivement de bactéries aérobies et de cyanobactéries en association symbiotique avec un ancêtre des eucaryotes.

Tableau 1.2
Contenu des cellules en ADN

Organisme	Taux d'ADN haploïde (en millions de pb)
Bactéries	
Mycoplasma genitalium	0,6
E. coli	4,7
Eucaryotes unicellulaires	
Saccharomyces cerevisiae (levure)	14
Dictyostelium discoideum	70
Euglena	3 000
Plantes	
Arabidopsis thaliana	70
Zea mais (maïs)	5 000
Animaux	
Caenorhabditis elegans (nématode)	100
Drosophila melanogaster (mouche)	165
Poulet	1 200
Souris	3 000
Homme	3 000



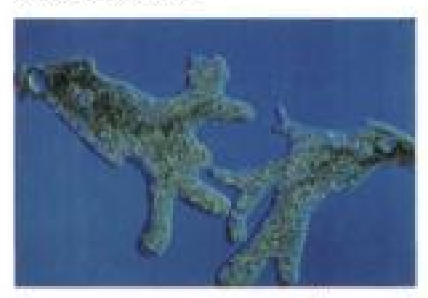
5 µm

Figure 1.9
Micrographie électronique à balayage de *Saccharomyces cerevisiae*. On a introduit une coloration artificielle dans la photographie. (Andrew Syed/Science Photo Library/Photo Researchers, Inc).

Apparition des organismes pluricellulaires

Beaucoup d'eucaryotes sont, comme les bactéries, des organismes unicellulaires capables d'autoréplication. Les eucaryotes les plus simples sont les **levures** ; une levure est plus complexe qu'une bactérie, mais plus simple et plus petite qu'une cellule animale ou végétale : une des mieux connues, *Saccharomyces cerevisiae*, a un diamètre de 6 µm et son ADN comporte 14 millions de paires de bases (figure 1.9). Il existe cependant d'autres eucaryotes unicellulaires bien plus complexes, certains contenant autant d'ADN qu'une cellule humaine (tableau 1.2). Ces unicellulaires complexes exécutent toutes sortes de tâches, comme la photosynthèse, la mobilité, la capture et l'ingestion de proies comme source alimentaire. Ainsi, *Amoeba proteus* est une cellule complexe, 100 000 fois plus volumineuse que *E. coli* ; sa longueur, étirée, peut atteindre 1 mm (figure 1.10). Les amibes sont en perpétuel mouvement grâce à des bras cytoplasmiques, les **pseudopodes**, capables d'approcher, d'engloutir et de digérer d'autres organismes, notamment des bactéries et des levures. D'autres eucaryotes unicellulaires (les algues vertes) possèdent des chloroplastes et effectuent la photosynthèse.

Figure 1.10
Micrographie optique de *Amoeba proteus*. (M. I. Walker/Photo Researchers, Inc).



0,2 mm

Les organismes pluricellulaires naquirent d'eucaryotes unicellulaires voilà un milliard d'années. Certains forment des agrégats multicellulaires qui font penser à une étape de transition dans l'évolution vers le caractère pluricellulaire ; c'est le cas de maintes algues (par exemple, *Volvox*), qui, accolées sous forme de colonie (figure 1.11) figurent, au point de vue évolutif, un précurseur de plante contemporaine. En spécialisant certaines de

leurs cellules, les agrégats coloniaux se muèrent en organismes pluricellulaires vrais. La spécialisation continue des cellules et la répartition des tâches au sein de la colonie aboutirent enfin à la complexité et à la diversité des nombreux types cellulaires dont se composent les plantes et les animaux contemporains, l'espèce humaine comprise.

Une plante comporte moins d'espèces cellulaires qu'un animal, mais chaque espèce est chargée d'une tâche particulière indispensable à l'organisme (figure 1.12) ; on y rencontre trois types principaux de systèmes tissulaires : tissu parenchymateux, tissu dermique et tissu vasculaire. Le tissu parenchymateux abrite les **cellules parenchymateuses**, siège des principales réactions métaboliques de la plante, entre autres la photosynthèse ; ce tissu contient aussi deux types de cellules spécialisées (cellules du **collenchyme** et du **sclérenchyme**) dont l'épaisse paroi cellulaire typique sert de

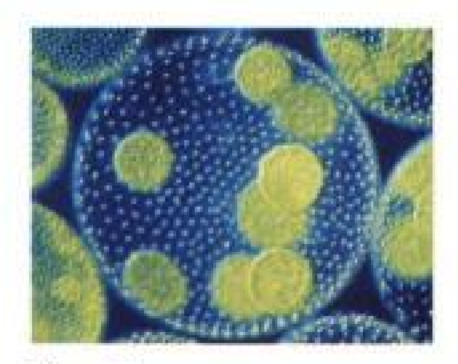
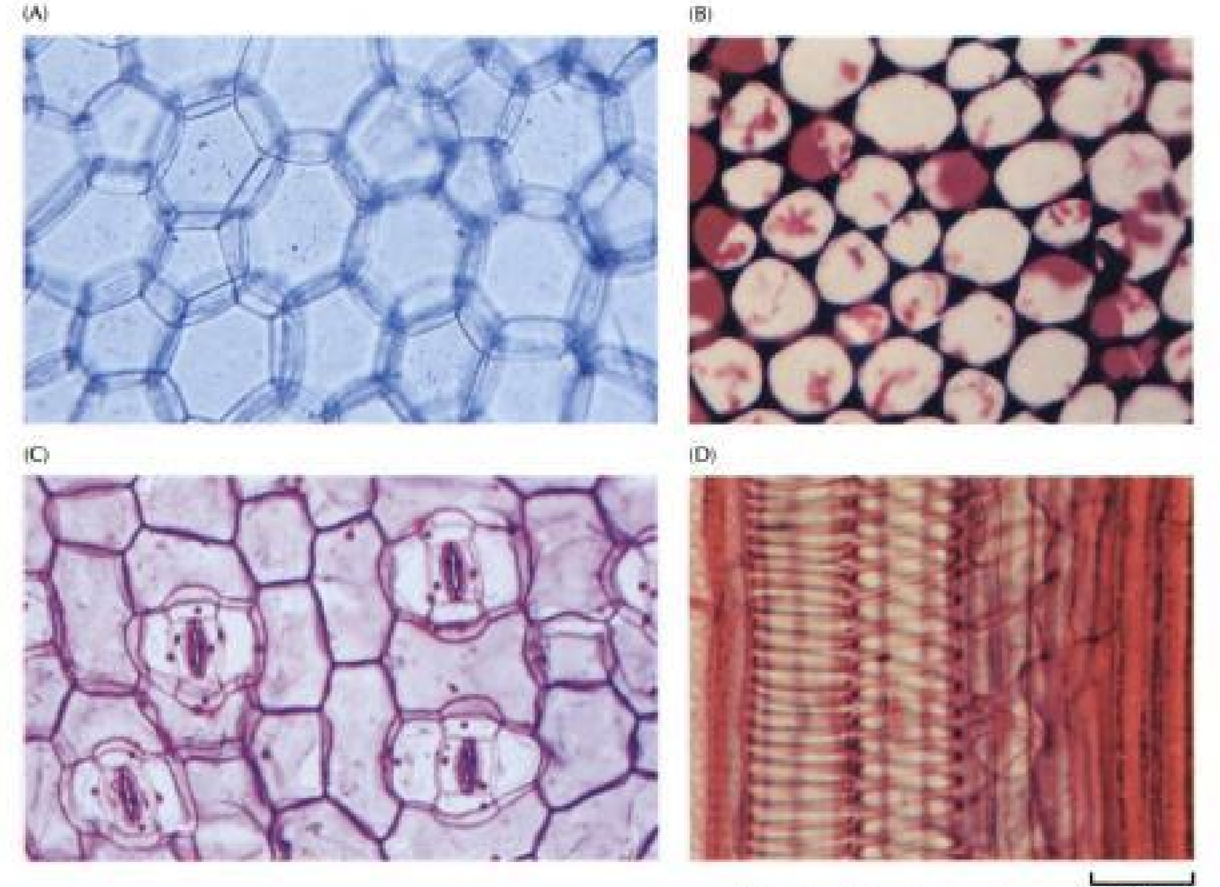


Figure 1.11
Algues vertes coloniales. Les cellules isolées de Volvox forment des colonies consistant en sphères creuses où siègent des centaines ou des milliers de cellules noyées dans une matrice gélatineuse. (Cabisco/Visuals Unlimited).

Figure 1.12
Micrographies optiques de cellules végétales typiques. (A) Cellules parenchymateuses, où ont lieu la photosynthèse et d'autres réactions métaboliques. (B) Cellules du collenchyme, servant de soutien, grâce à leur épaisse paroi. (C) Cellules épidermiques de la surface d'une feuille. De petits pores (stomates) sont creusés entre deux cellules spécialisées, les cellules sentinelles. (D) Eléments des vaisseaux et trachéides sont des cellules allongées mises bout à bout pour former les canaux du xylème. (A, Jack M. Bastsack/Visuals Unlimited ; B, A. J. Karpoff/Visuals Unlimited ; C, Alfred Owczarzak/Biological Photo Service ; D, Biophoto Associates/Science Source/Photo Researchers, Inc).



soutien à la plante. Les tissus dermiques couvrent la surface des organismes végétaux et se composent de **cellules épidermiques** qui forment une couche protectrice et absorbent les aliments. Plusieurs types de cellules allongées composent le système vasculaire (xylème et phloème) par où cheminent, à travers la plante, l'eau et les substances nutritives.

La variété des cellules est bien plus grande chez les animaux que chez les plantes. Le corps humain, par exemple, comporte 200 types de cellules distinctes, groupées habituellement en cinq types de tissus : épithélial, conjonctif, sanguin, nerveux et musculaire (figure 1.13). Les **cellules épithéliales** sont des lames qui couvrent la surface du corps et bordent les organes internes ; il en existe divers types, chacun avec son rôle, par

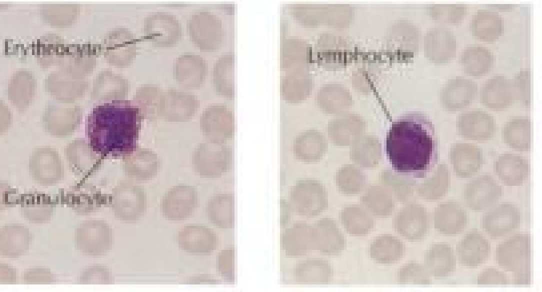
(A)i Bouche

(A)ii Voies biliaires

(A)iii Intestin

(B)

(C)



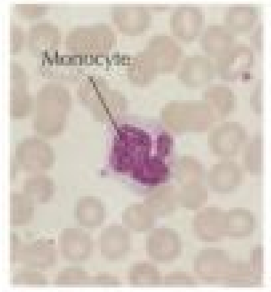


Figure 1.13
Micrographies optiques de cellules animales typiques.
(A) Cellules de l'épithélium buccal (multistratifié épais), des voies biliaires et de l'intestin. (B) Les fibroblastes sont des cellules fusiformes caractéristiques du tissu conjonctif. (C) Erythrocytes, granulocytes, lymphocytes et monocytes du sang humain. (A)i et (A)ii, G. W. Willis/Biological PhotoService ; (A)iii, BiophotoAssociates/Photo Researchers, Inc ; B, Don W. Fawcett/Visuals Unlimited ; C, G. W. Willis/Biological Photo Service.

exemple, de protection (peau), d'absorption (cellules bordant l'intestin grêle), de sécrétion (cellules de la glande salivaire). Le tissu conjonctif comprend l'os, le cartilage, le tissu adipeux, chacun avec son type propre de cellules, (respectivement ostéoblastes, chondrocytes et adipocytes). Le tissu conjonctif lâche sous-jacent aux cellules épithéliales et comblant les espaces entre organes et tissus du corps est constitué d'un autre type de cellule, le **fibroblaste**. Le sang contient plusieurs types de cellules, certaines pour le transport d'oxygène (les globules rouges ou **érythrocytes**), d'autres, support des réactions inflammatoires (granulocytes, monocytes et macrophages) ou acteurs de la réponse immunitaire (lymphocytes). Le tissu nerveux comprend les **neurones**, hautement spécialisés dans la transmission des signaux d'un bout à l'autre de l'organisme. Divers types de cellules sensorielles, dans l'œil ou l'oreille par exemple, se sont spécialisés à recevoir des signaux du milieu environnant. Enfin, certains types de cellules musculaires sont le siège de la motilité et exercent une force physique.

Il est clair que l'évolution des animaux implique l'invention d'une diversité considérable et d'une spécialisation adéquate des cellules. L'un des buts principaux de la biologie moléculaire est de saisir les mécanismes qui dirigent la croissance et la différenciation de cet arsenal de cellules spécialisées, nées d'une seule cellule, l'œuf fécondé.

TYPES CELLULAIRES EXPÉRIMENTAUX

Le fait que les cellules contemporaines descendent d'un ancêtre commun a une implication majeure pour la biologie moléculaire en tant que science expérimentale, en ceci que, les propriétés fondamentales de toutes les cellules s'étant conservées au cours de l'évolution, il est permis d'extrapoler à diverses cellules les principes tirés d'expériences effectuées avec un type donné de cellule. D'autre part, vu la diversité des cellules contemporaines, il sera plus facile d'effectuer toute une série d'expériences sur tel type de cellule que sur tel autre type. Quand il désire résoudre maintes questions de biologie cellulaire et moléculaire, l'expérimentateur dispose de différentes espèces de cellules et d'organismes. Etudions les propriétés de certaines des cellules dont l'expérimentateur peut tirer profit.

E. coli

Grâce à leur relative simplicité, les cellules de procaryotes (bactéries) sont des modèles rêvés pour fouiller maints aspects de la biochimie et de la biologie moléculaire. L'espèce de bactérie la mieux connue est *E. coli*, l'un des organismes choisis pour élucider les mécanismes fondamentaux de la génétique moléculaire. Les travaux entrepris sur cette obscure bactérie ont forgé les concepts modernes de la biologie moléculaire, notamment sur la réplication d'ADN, le code génétique, l'expression des gènes et la synthèse protéique.

L'intérêt des biologistes moléculaires pour *E. coli* vient de sa relative simplicité et de la facilité avec laquelle on fait proliférer cette cellule et la manipule au laboratoire. Le génome de *E. coli*, comprend près de 4 millions de paires de bases et code environ 4 000 protéines. Le génome humain est presque mille fois plus grand (environ 3 milliards de paires de bases) et code 100 000 protéines environ (voir tableau 1.2). La petite taille du génome de *E. coli* est propice à l'analyse génétique et on est arrivé à identifier le rôle des produits de près de la moitié des gènes de *E. coli*.

La prolifération rapide de *E. coli* dans des conditions optimales de culture facilite aussi les expériences de génétique moléculaire ; selon les conditions dans lesquelles on le cultive, *E. coli* prend de 20 à 60 minutes pour se diviser. En outre, pour en obtenir une population clonale, c'est-à-dire dont toutes les cellules proviennent d'une même cellule souche, il suffit d'en

Figure 1.14
Colonies bactériennes. Colonies de bactéries *E. coli* ayant proliféré sur un milieu de culture en agar. (A. M. Siegelman/Visuals Unlimited).



prélever une colonie qui a poussé sur un milieu de culture en agar (figure 1.14). Comme il suffit d'une nuit pour obtenir des colonies bactériennes faites de quelque 10^8 cellules, on choisit aisément et rapidement les variants génétiques d'une souche de *E. coli*, par exemple des mutants résistants à un antibiotique comme la pénicilline. Ce sont là les avantages qui ont garanti la réussite des expériences sur lesquelles reposent les principes de la génétique moléculaire, exposés au chapitre 3.

Les milieux optimaux pour la prolifération de *E. coli* contiennent du glucose, des sels et plusieurs composés organiques, comme des acides aminés, des vitamines et les précurseurs d'acides nucléiques, mais cette bactérie prolifère aussi dans des milieux « minima », constitués seulement de sels, d'une source d'azote (NH_3) et d'une source de carbone, tel le glucose ; dans un tel milieu, la bactérie prolifère plus lentement (elle se divise toutes les 40 minutes), car elle doit synthétiser tous ses acides aminés, nucléotides et autres composés organiques. Cette faculté qu'a *E. coli* d'effectuer ces réactions de synthèse dans un milieu de culture artificiel aussi rudimentaire s'est révélée très utile quand on a voulu élucider les voies biochimiques en jeu. La prolifération rapide et les exigences nutritionnelles réduites de *E. coli* ont grandement facilité les expériences clé tant de la biochimie que de la biologie moléculaire.

Levures

Si les bactéries furent le cheval de bataille des biologistes cherchant à déchiffrer les rouages communs à toutes les cellules, les bactéries ne conviennent évidemment pas à l'étude de la structure et des fonctions des eucaryotes. Les levures, les plus simples parmi les eucaryotes, possèdent des avantages expérimentaux semblables à ceux de *E. coli* ; aussi furent-elles un modèle clé dans l'étude des aspects fondamentaux de la biologie des eucaryotes.

Le génome de la levure utilisée par la plupart des expérimentateurs, *Saccharomyces cerevisiae*, comporte 14 millions de paires de bases, soit 3 fois le génome de *E. coli*, mais il est malgré cela encore très aisé à manipuler en comparaison du génome des eucaryotes plus complexes, l'Homme par exemple. Bien que rudimentaire, la cellule de levure partage les traits particuliers de la cellule eucaryote (figure 1.15) : noyau bien visible, bordé de l'enveloppe nucléaire, ADN génomique réparti en 16 chromosomes non refermés sur eux-mêmes, cytoplasme à cytosquelette et organites subcellulaires.

On fait facilement pousser les levures au laboratoire et on les étudie par les approches de la génétique moléculaires qui furent si productives avec *E. coli*. Bien qu'elles prolifèrent moins vite que les bactéries, les levures se divisent quand même toutes les 2 heures et on peut en obtenir une colonie en partant d'une seule cellule. Aussi servent-elles à toutes les manipulations génétiques du genre de celles qu'on a effectuées sur les bactéries.

Ces propriétés ont fait des levures les cellules eucaryotes les plus abordables du point de vue du biologiste moléculaire. Leurs mutants ont joué un rôle important dans l'élucidation de maints processus fondamentaux présents chez les eucaryotes, entre autres la réplication d'ADN, la transcription, la maturation des ARN, le tri des protéines, la régulation du cycle cellulaire, points sur lesquels on reviendra ultérieurement. L'unité de la biologie moléculaire de la cellule ressort clairement du fait que les principes généraux régissant la structure et la fonction cellulaires révélés par les travaux sur les levures s'appliquent à toutes les cellules d'eucaryotes.

Figure 1.15
Micrographie électronique de *Saccharomyces cerevisiae*.
(David Scharf/Peter Arnold, Inc.).



Dictyostelium discoideum

Dictyostelium discoideum est une moisissure visqueuse qui est, comme la levure, un eucaryote unicellulaire encore assez simple. Son génome, d'à

peu près 10 fois la taille de celui de *E. coli*, est plus complexe que celui de la levure, mais beaucoup plus simple que les génomes d'eucaryotes supérieurs. De plus, cet organisme pousse facilement *in vitro* et on peut le soumettre à toutes sortes de manipulations génétiques.

Bien nourri, *Dictyostelium* se présente comme une amibe unicellulaire se nourrissant de bactéries et de levures. Étant très mobile, elle fut choisie comme modèle pour élucider les mécanismes moléculaires responsables de la motilité des cellules animales (figure 1.16) ; des mutations choisies à propos ont révélé le rôle joué par plusieurs gènes dans la motilité cellulaire.

Un autre trait captivant de *Dictyostelium* est que ses cellules isolées peuvent se rassembler en formant des structures pluricellulaires ; en cas de pénurie alimentaire, ses cellules s'agglomèrent en structures vermiculées appelées « limaces », groupant jusqu'à 100 000 cellules qui fonctionnent comme un tout. Il semble donc que *Dictyostelium* est à cheval sur la frontière entre unicellulaires et pluricellulaires, servant en cela de modèle important dans l'étude des signaux cellulaires et des interactions entre cellules.

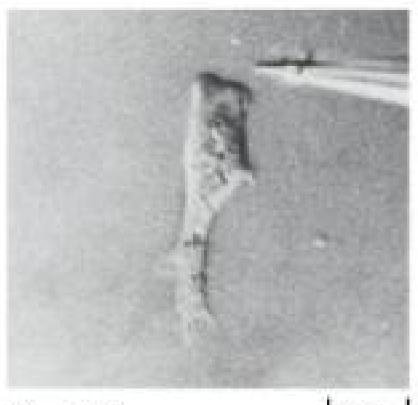


Figure 1.16
Dictyostelium discoideum.
L'amibe se dirige vers l'extrémité de la pipette, en haut de la figure. (Aimablement transmis par le Dr. Joel Swanson, Harvard Medical School).

Caenorhabditis elegans

Si les eucaryotes unicellulaires *Saccharomyces* et *Dictyostelium* sont d'excellents modèles dans l'étude de la cellule eucaryotique, le développement embryonnaire des organismes pluricellulaires demande une recherche expérimentale approfondie sur les plantes et les animaux, qui sont des entités bien plus complexes. On s'est adressé alors au nématode *Caenorhabditis elegans* (figure 1.17) ; il possède quelques caractères remarquables qui en font un des modèles clés pour étudier la différenciation cellulaire et le développement embryonnaire.

Bien que le génome de *Caenorhabditis* (~ 100 millions de paires de bases) soit plus grand que celui des eucaryotes unicellulaires, il est plus simple et plus aisément manipulable que celui de la plupart des animaux. *C. elegans* est un organisme pluricellulaire assez simple : l'adulte se compose de 959 cellules **somatiques** et de 1 000 à 2 000 cellules **germinales** ; il est très facile de le cultiver et de le manipuler génétiquement au laboratoire.

Grâce à la simplicité de *C. elegans*, on a pu suivre au microscope le décours du développement de son embryon, notamment retrouver l'origine embryonnaire et l'arbre généalogique de toutes les cellules qui constituent l'adulte. En révélant l'existence de mutations responsables d'anomalies du développement, les travaux de génétique ont permis d'isoler et de caractériser les principaux gènes qui pilotent le développement embryonnaire et la différenciation des tissus du nématode. Insistons sur le fait qu'on a retrouvé des gènes semblables, et exprimés, chez les animaux plus complexes (y compris l'Homme) ; aussi *C. elegans* est-il un modèle de choix pour étudier le développement embryonnaire des animaux.

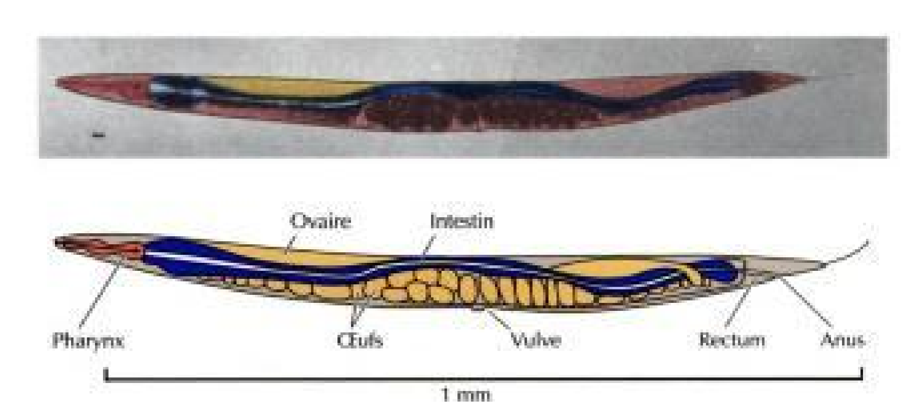


Figure 1.17
Caenorhabditis elegans.
(D'après J. E. Sulston et H. R. Horvitz, 1977, *Dev. Biol.* **56** :110)



Figure 1.18
Drosophila melanogaster.
(Darwin Dale/Photo Researchers, Inc)

Drosophila melanogaster

Comme *C. elegans*, la mouche du vinaigre *Drosophila melanogaster* (figure 1.18) est un organisme modèle de premier ordre pour l'embryologiste. Le génome de la drosophile est d'une taille comparable à celui de *C. elegans* ; cette mouche, se reproduisant en deux semaines au laboratoire, est un organisme idéal pour l'analyse génétique. Maints concepts fondamentaux de la génétique, notamment le rapport entre gènes et chromosomes, s'appuient sur des travaux effectués chez la drosophile au début du siècle (voir chapitre 3).

Des études approfondies de génétique sur la drosophile ont mis en évidence de nombreux gènes qui pilotent le développement embryonnaire et la différenciation cellulaire, et les méthodes modernes de la biologie moléculaire ont permis de connaître comment fonctionnent ces gènes. C'est pourquoi les travaux sur la drosophile ont révélé de façon surprenante les mécanismes moléculaires qui gouvernent l'embryologie chimique des animaux, notamment quant à la formation du profil corporel des animaux pluricellulaires complexes. Comme des gènes et des mécanismes semblables non seulement à ceux de *C. elegans* mais aussi à ceux de la drosophile existent chez les vertébrés, on comprend l'attrait exercé par la drosophile comme modèle expérimental auprès des embryologistes moléculaires.

Arabidopsis thaliana

La biologie moléculaire et le développement embryonnaire des plantes sont des domaines en pleine expansion, vu leur grande importance économique et leur attrait conceptuel. Comme la complexité des génomes végétaux n'est pas moindre que celle des génomes animaux (voir tableau 1.2), on a cherché un végétal relativement peu complexe rassemblant les avantages de *C. elegans* et de *Drosophila* ; les biologistes ont porté leur choix sur un petit phanérogame, l'arabette *Arabidopsis thaliana* (figure 1.19), devenue à présent le modèle rêvé pour l'étude des végétaux.

A. thaliana est remarquable par la petite taille de son génome, à savoir 70 millions de paires de bases environ, soit seulement cinq fois plus grand que le génome de *Saccharomyces* et à peu près de la taille des génomes de *C. elegans* et de *Drosophila*. En outre, *Arabidopsis* est facile à cultiver et on dispose de méthodes moléculaires pour manipuler le génome de cette plante. Les chercheurs sont arrivés à identifier certains gènes en jeu dans diverses étapes du développement des tissus de cette plante, notamment ceux des fleurs. L'examen de ces gènes indique de nettes similitudes dans les mécanismes qui dirigent le développement embryonnaire chez les plantes et chez les animaux, réaffirmant par là l'unité fondamentale de la biologie moléculaire de la cellule.



Figure 1.19
Arabidopsis thaliana. (Jeremy Burgess/Photo Researchers, Inc)



Vertébrés

Les animaux les plus complexes sont les vertébrés, notamment l'Homme et les autres mammifères. Le génome humain comporte près de 3 milliards de paires de bases, soit 30 fois plus que celui de *C. elegans*, de *Drosophila* ou de *Arabidopsis*. En outre, le corps humain se compose de plus de 200 espèces de cellules spécialisées. Voilà pourquoi il est si difficile d'étudier la biologie cellulaire et la biologie moléculaire des vertébrés ; nonobstant cette difficulté, l'attrait pour les sciences biologiques vient en grande partie de notre désir de comprendre le fonctionnement du corps humain ; sachons aussi que maints problèmes de portée concrète immédiate (par exemple, en médecine) ne seront résolus qu'en étudiant directement les divers types de cellules humaines (ou celles qui leur sont étroitement apparentées).

Une ressource majeure dans l'étude des cellules de l'Homme et des autres mammifères est de prélever des cellules et de les cultiver au laboratoire, pour pouvoir les manipuler dans un environnement connu de l'expérimentateur. La culture de cellules a ouvert la voie à de nouveaux domaines de la biologie des cellules mammaliennes, notamment celui des mécanismes de réplication de l'ADN, de l'expression des gènes, de la syn-

thèse et de la maturation des protéines ainsi que de la division cellulaire. De plus, dès qu'on put cultiver des cellules en milieu entièrement synthétique, on se mit à étudier les mécanismes de signalisation qui dirigent la prolifération et la différenciation normales des cellules au sein d'un organisme.

La spécialisation normale des cellules très différenciées en fait des modèles de choix quand on désire étudier des aspects particuliers de la biologie cellulaire. C'est le cas de la cellule musculaire, spécialisée dans la contraction, qui engendre force et déplacement : de par cette spécialisation, cette cellule est un modèle indispensable à l'étude de la motilité cellulaire à l'échelle moléculaire. Un autre cas est celui du neurone, adapté à la conduction électrochimique des signaux sur de grandes distances. Chez l'Homme, certains axones cellulaires atteignent plus d'un mètre ; certains invertébrés, comme le calmar, possèdent des neurones géants dont les axones atteignent 1 mm de diamètre. Vu leur structure et leur fonction tellement spécialisées, ces neurones géants ont servi de modèle quand on a étudié le transport d'ions à travers la membrane plasmique et le rôle du cytosquelette dans la migration intracytoplasmique des organites.

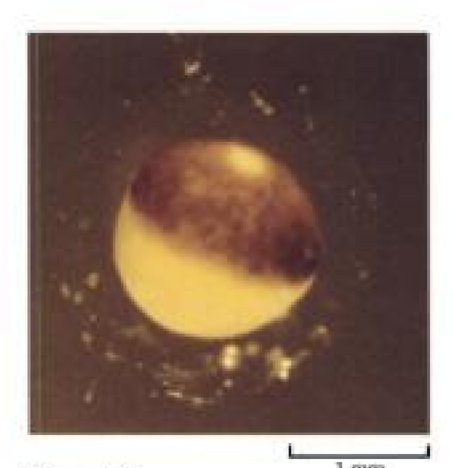


Figure 1.20
Œuf de la grenouille *Xenopus laevis*. (Aimablement transmis par Jeremy Green, Dana-Farber Cancer Institute)

La grenouille *Xenopus laevis* sert de modèle dans l'étude de l'embryogenèse précoce des vertébrés. Ses œufs sont exceptionnellement volumineux, avec un diamètre de près de 1 mm (figure 1.20) ; comme ils se muent en embryon en dehors de la mère, l'expérimentateur a directement sous la main les stades qui transforment l'embryon en têtard. En outre, le grand nombre d'œufs qu'on peut récolter facilite les analyses biochimiques. Vu ces considérations pratiques, on s'est beaucoup servi du xénope pour étudier le développement embryonnaire et on en a tiré de nombreux enseignements quant aux mécanismes moléculaires qui commandent le développement, la différenciation et la division des cellules embryonnaires.

Parmi les mammifères, les généticiens ont toujours préféré travailler sur la souris. Bien que les difficultés techniques inhérentes à la génétique de la souris (comparée à celle de la drosophile ou de la levure) soient grandes, on a identifié plusieurs mutations frappant le développement de l'embryon de souris. Une remarquable percée de la biologie moléculaire est d'ailleurs la possibilité d'obtenir des **souris transgéniques***, c'est-à-dire des souris dans la lignée germinale desquelles on a introduit des gènes choisis d'avance, de façon à connaître leur influence sur le développement embryonnaire ou d'autres aspects du fonctionnement cellulaire, considérés dans le contexte





Figure 1.21
La souris comme modèle du développement de l'embryon humain. Cet enfant et cette souris souffrent du même défaut de pigmentation (albinisme partiel), dû à une mutation dans le gène dirigeant la migration normale des mélanocytes (cellules auxquelles la peau doit sa pigmentation) au cours du développement embryonnaire (Aimablement transmis par R. A. Fleischman, University of Texas Southwestern Medical Center).

* *NdT* : …et à présent des clones de souris (*Nature* **394** : 369. 1998).

de l'animal pris comme un tout. Que la souris serve assez fidèlement de modèle à l'embryogenèse humaine n'est plus étonnant puisque des mutations dans des gènes homologues aboutissent aux mêmes défauts du développement embryonnaire chez les deux espèces, par exemple dans le cas d'un albinisme partiel (figure 1.21).

INSTRUMENTS DE LA BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

Comme toute science expérimentale, la biologie cellulaire est asservie aux méthodes de laboratoire disponibles pour distinguer les structures et les fonctions de la cellule. Beaucoup de percées majeures dans ce domaine ont suivi de peu la mise au point de techniques originales qui ouvraient la voie à de nouvelles recherches. Pour évaluer l'état actuel et les bonds futurs de ce domaine en pleine révolution, il nous paraît important d'estimer à leur juste mesure les outils expérimentaux dont dispose le biologiste intéressé par la cellule. Les sections qui suivent présentent certaines des méthodes générales importantes pour le biologiste cellulaire ; d'autres approches expérimentales, entre autres celles de la biochimie et de la biologie moléculaire, seront présentées dans les chapitres suivants.

Microscopie optique

Comme les cellules sont, pour la plupart, trop petites pour qu'on les voie à l'œil nu, leur examen a toujours dépendu de l'utilisation des microscopes ; la découverte des cellules a d'ailleurs suivi la mise au point du microscope : c'est en examinant un morceau de liège avec un microscope rudimentaire que Robert Hooke conçut l'idée de cloisonnement et forgea le terme de « cellule » en 1665 (figure 1.22). À l'aide d'un microscope grossissant les objets environ 33 fois, Antony van Leeuwenkoek pouvait examiner, dans les années '1670, divers types de cellules, comme des spermatozoïdes, des hématies et des bactéries. On admet habituellement que la biologie cellulaire moderne est née de la théorie cellulaire proposée par Matthias Schleiden et Theodor Schwann en 1838 ; l'examen de tissus végétaux par Schleiden et de tissus animaux par Schwann menaient à la même conclusion : tous les organismes se composent de cellules. On remarqua peu après que les cellules n'apparaissent pas *de novo*, mais toujours par division d'une cellule mère ; c'est donc par l'observation au microscope optique que la cellule acquit son statut d'unité fondamentale de tous les organismes vivants.

Figure 1.22
Structure en cellules du liège.
Dessin, par Robert Hooke, d'une fine tranche de liège vue au microscope optique. Les « cellules » décrites par Hooke sont en fait les parois cellulosiques de cellules mortes depuis longtemps.

Le microscope n'a pas cessé d'être un instrument de base du biologiste cellulaire et les améliorations qu'on lui a apportées permettent de déceler des détails de plus en plus fins de la structure cellulaire. Aujourd'hui, les microscopes optiques agrandissent les objets environ 1 000 fois ; comme la plupart des cellules ont un diamètre situé entre 1 et 100 µm, elles sont reconnaissables au microscope optique et on peut même y voir les plus grands organites, comme le noyau, les chloroplastes, les mitochondries. Cet instrument est cependant impuissant à révéler les détails plus fins de la structure cellulaire, pour lesquels le **pouvoir de résolution**, c'est-à-dire la capacité de distinguer des objets séparés par une distance donnée, est encore plus important que le grossissement. On peut agrandir à volonté une image (par exemple, en la projetant sur un écran) sans pour autant améliorer la définition des détails observables.

La limite de résolution du microscope optique est d'à peu près 0,2 µm ; deux objets séparés par une distance inférieure à cette valeur se confondent sous l'œil de l'observateur. Cette limite théorique du microscope optique dépend de deux facteurs, la longueur d'onde (λ) de la lumière visible et la puissance de convergence de la lentille du microscope (ouverture numérique, *ON*) selon l'équation:

$$\text{Pouvoir de résolution} = \frac{0{,}61\lambda}{ON}$$

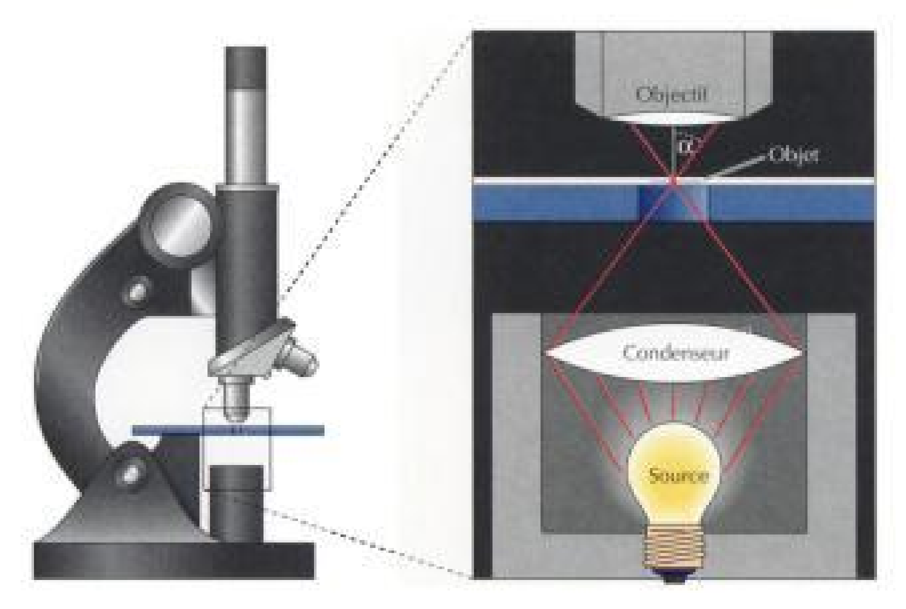


Figure 1.23
Ouverture numérique. La lumière est focalisée sur l'objet par la lentille du condenseur, puis reprise par la lentille de l'objectif du microscope. L'ouverture numérique dépend de l'angle du cône de lumière frappant l'objectif (α) et de l'indice de réfraction du milieu (l'air ou l'huile à immersion) séparant l'objectif de l'objet.

Comme la longueur d'onde de la lumière visible va de 0,4 à 0,7 µm, la valeur moyenne de λ est de 0,5 µm pour le microscope optique. L'ouverture numérique se conçoit comme l'ouverture du cône de lumière qui atteint l'objectif du microscope après avoir traversé l'échantillon (figure 1.23) ; elle est donnée par

$$ON = \eta \sin \alpha$$

où η est l'indice de réfraction du milieu séparant l'objet de l'objectif ; pour l'air, η = 1, 0, mais on peut l'accroître jusqu'à près de 1,4 au moyen d'une lentille à immersion qu'on sépare de l'objet par une goutte d'huile à immersion au lieu d'air. L'angle α est la moitié de l'angle au centre du cône du faisceau lumineux qui entre dans l'objectif ; la valeur maximale de α est de 90 degrés, soit sin α = 1,0 ; la valeur maximale de l'ouverture numérique est donc de 1,4.

La limite théorique du pouvoir de résolution du microscope optique est donc donnée par :

$$\text{Pouvoir de résolution} = \frac{0{,}61 \times 0{,}5}{1{,}4} = 0{,}22\ \mu\text{m}$$

Dès la fin du XIX[e] siècle, on possédait déjà des microscopes atteignant cette résolution ; on ne doit plus s'attendre à la voir améliorée.

Il existe plusieurs types de microscopes optiques, adaptés à l'observation de divers aspects des structures cellulaires. Le plus simple est le **microscope à fond clair**, dans lequel la lumière traverse directement la cellule examinée ; la visibilité des détails d'une cellule dépend du contraste dû à l'absorption de la lumière par les diverses parties de la cellule. Souvent, on doit colorer les cellules avec des pigments qui se fixent aux protéines ou aux acides nucléiques, de façon à accroître le contraste entre les différentes parties de la cellule. Avant d'effectuer la coloration, on traite généralement l'échantillon par un fixateur (alcool, acide acétique, formaldéhyde) de façon à stabiliser et à conserver ses structures. L'examen de tissus fixés et colorés au microscope à fond clair est la méthode classique pour étudier les échantillons de tissus au laboratoire d'histologie (figure 1.24). Comme ces méthodes de coloration tuent les cellules, elles ne conviennent pas à certaines expériences, notamment à celles où le biologiste désire observer la cellule vivante.

En l'absence de coloration, le passage du faisceau lumineux à travers l'objet ne produit pas un contraste suffisant pour distinguer les principales structures cellulaires et limite l'usage du microscope à fond clair. Cepen-

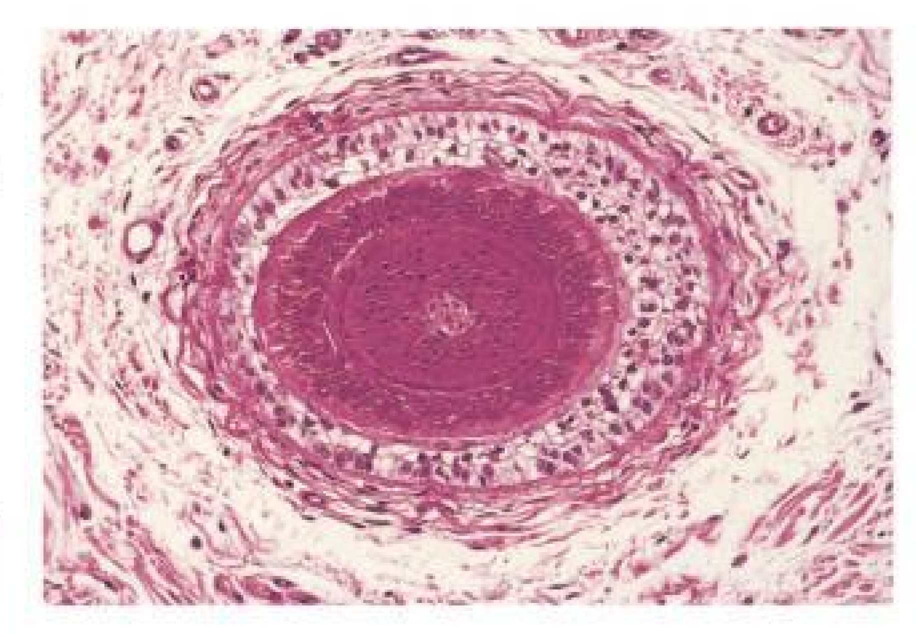
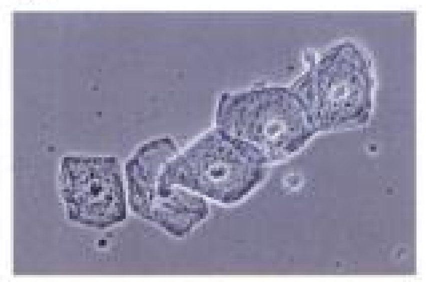


Figure 1.24
Micrographie sur champ clair d'un tissu coloré. Coupe transversale d'un follicule pileux de peau humaine, coloré à l'hématoxyline et à l'éosine (G. W. Willis/Biological PhotoService).

(A)



(B)



(C)



50 µm

Figure 1.25
Cellules vivantes vues au microscope. Microphotographies de cellules de la muqueuse buccale vues (A) au microscope à fond clair, (B) au microscope de contraste de phase et (C) en microscopie d'interférence différentielle (Aimablement communiqué par Mort Abramowitz, Olympus America, Inc).

dant, on a su adapter l'optique du microscope pour augmenter le contraste entre les ondes lumineuses qui traversent des structures cellulaires de densité différente. Les deux méthodes habituelles pour observer les cellules vivantes sont la **microscopie à contraste de phase** et la **microscopie à contraste d'interférence différentielle** (figure 1.25). Les deux types de microscopes emploient des systèmes optiques qui transforment les variations de densité ou d'épaisseur entre points voisins de la cellule en différences de contraste rendues dans l'image finale. Au microscope à fond clair, les structures transparentes, comme le noyau, sont peu contrastées, car elles absorbent peu la lumière, mais en traversant ces structures, les ondes lumineuses sont ralenties, de sorte que leur phase ne correspond plus à la phase de la lumière qui a traversé le cytoplasme environnant. En transformant ces différences de phase en différences de contraste, le microscope à contraste de phase et le microscope à contraste d'interférence différentielle donnent des images satisfaisantes des cellules non colorées.

La puissance du microscope optique a été très fort améliorée grâce à la caméra vidéo et à l'analyse d'images par ordinateur. Ces systèmes électroniques d'interprétation d'images augmentent notablement le contraste des images formées par le microscope optique, en révélant d'ailleurs de petits éléments invisibles avec les autres instruments. Ainsi, la microscopie à contraste d'interférence différentielle améliorée par vidéo a permis de voir les organites glisser sur les microtubules qui sont des filaments de seulement 0,025 µm de diamètre (figure 1.26) ; cette amélioration technique n'arrive cependant pas à reculer la limite théorique du pouvoir séparateur du microscope optique, soit 0,2 µm ; bien qu'elle fasse apparaître les microtubules, l'amplification vidéo les montre sous forme d'images floues d'au moins 0,2 µm de diamètre et ne peut pas distinguer un filament isolé d'avec un faisceau de structures adjacentes.

En marquant des molécules pour pouvoir les retrouver au sein des structures cellulaires, on a fait de la microscopie optique une méthode d'analyse moléculaire. On décèle n'importe quel gène en l'hybridant à une sonde d'acide nucléique complémentaire et on retrouve une protéine donnée grâce à l'anticorps approprié (voir chapitre 3) ; tant la sonde d'ADN que l'anticorps seront, au préalable, marqués d'un signe visible au microscope

optique, de sorte qu'on pourra préciser la place occupée par telle ou telle molécule dans la cellule étudiée.

Le **microscope à fluorescence** est un instrument courant et très sensible pour examiner la distribution des molécules dans une cellule (figure 1.27). À la molécule étudiée, on attache un groupe fluorescent, par réaction sur la cellule fixée ou sur la cellule vivante. Une molécule fluorescente est une molécule qui absorbe une bande de longueur d'onde donnée et émet de la lumière d'une autre longueur d'onde (plus élevée) ; on éclaire l'objet avec un faisceau lumineux d'une longueur d'onde qui excite la substance fluorescente, puis on observe, au travers de filtres appropriés, l'image formée par la lumière de longueur d'onde émise par la substance fluorescente. La microscopie à fluorescence sert à repérer toutes sortes de molécules au sein des cellules ; souvent on marque par un groupe fluorescent les anticorps dirigés contre une protéine donnée, et on examine sa distribution intracellulaire.

La **microscopie confocale** combine la microscopie à fluorescence à une analyse tridimensionnelle d'images par ordinateur. Un mince faisceau lumineux, envoyé par un laser, est focalisé à une profondeur définie de l'objet étudié ; la lumière fluorescente émise est reçue par un détecteur, par exemple une caméra vidéo, mais auparavant le faisceau doit traverser un minuscule orifice (le diaphragme confocal) placé exactement au point où se focalise la lumière envoyée par le plan choisi dans l'objet (figure 1.28) ; ainsi seule la lumière issue de ce plan peut atteindre le détecteur. En balayant ce plan avec le faisceau, on récolte une image bidimensionnelle du plan de focalisation bien plus nette que celle qu'on obtient au microscope à fluorescence ordinaire (figure 1.29). Les « coupes » en série ainsi obtenues permettent en outre de reconstruire l'image tridimensionnelle de l'objet.

Microscopie électronique

Puisque le pouvoir de résolution du microscope optique est limité, les biologistes ont dû trouver des microscopes plus puissants, notamment le microscope électronique, mis au point dans les années '30 et utilisé en biologie par les pionniers qu'étaient Albert Claude, Keith Porter et George Palade dans les années '40 et '50. La résolution atteinte par le microscope électronique dépasse de loin celle obtenue dans le microscope optique, car

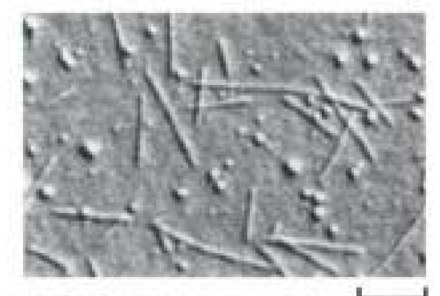


Figure 1.26
Microscopie en contraste d'interférence différentielle agrandie par vidéo. En améliorant les images par ordinateur, on peut observer des microtubules séparés (Aimablement transmis par E. D. Salmon, University of North Carolina, Chapell Hill).

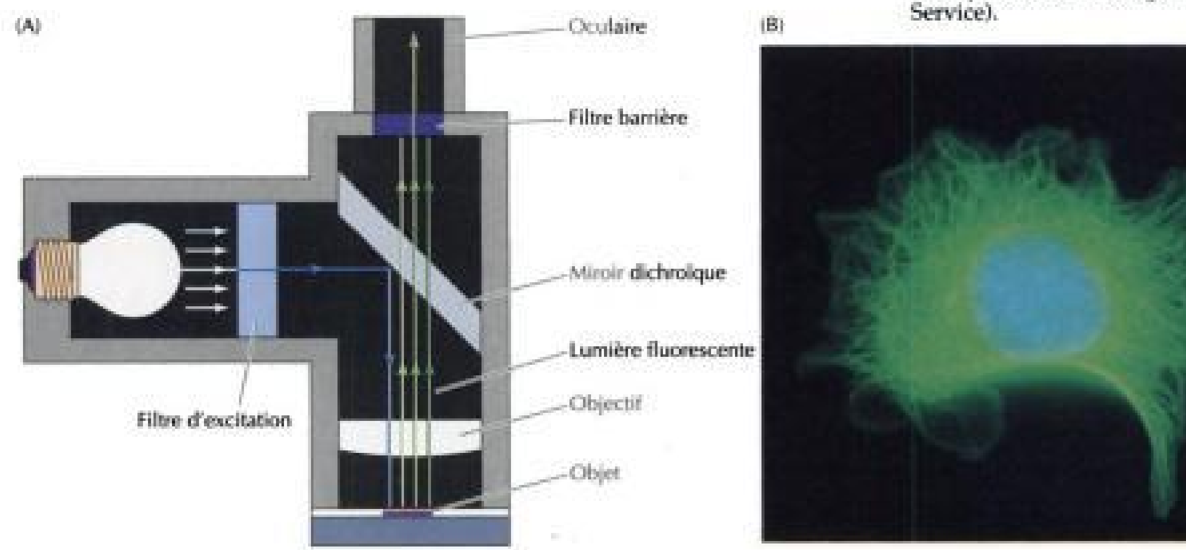


Figure 1.27
Microscopie en fluorescence. (A) Le faisceau traverse un filtre destiné à sélectionner la longueur d'onde (par exemple, une lumière bleue) qui excite la substance fluorescente. Un miroir dichroïque envoie ensuite le faisceau sur l'objet. La lumière de fluorescence (par exemple, verte) émise par les structures marquées de l'objet traverse le miroir dichroïque et un second filtre (le filtre barrière) qui sélectionne la longueur d'onde de la lumière émise par le marqueur fluorescent. (B) Micrographie en fluorescence d'une cellule de poumon de têtard où on a coloré l'ADN en bleu et les microtubules cytoplasmiques en vert (Conly S. Rieder/Biological Photo Service).

Détecteur
La lumière du plan bien mis au point atteint le détecteur
Ouverture confocale
Rayons non au point déviés en dehors du détecteur
Lumière fluorescente émise
Au point
Non au point
Objet

Figure 1.28
Microscopie confocale
On focalise un pinceau de lumière sur l'objet, à une profondeur choisie, et on concentre la lumière fluorescente émise sur un détecteur. En avant du détecteur, la lumière fluorescente émise par l'objet doit passer par une ouverture confocale placée au point où la lumière émise du plan de l'objet choisi forme un foyer. Aussi ne recueille-t-on sur le détecteur que les rayons issus de la mise au point sur ce plan de l'objet.

la longueur d'onde des électrons est très inférieure à celle de la lumière : elle peut descendre jusqu'à 0,004 nm, soit 100 000 fois plus petite que celle de la lumière visible. Cette longueur d'onde devrait théoriquement permettre d'atteindre une définition de 0,002 nm, mais pas en pratique, car la résolution ne dépend pas seulement de λ, mais aussi de l'ouverture numérique de la lentille du microscope. L'angle d'ouverture est un facteur très limitant pour le microscope électronique, à cause d'une particularité des lentilles électromagnétiques, à savoir que leur angle d'ouverture ne dépasse pas 0,5 degré, ce qui correspond à une ouverture numérique de 0,01. Dans les conditions optimales, le pouvoir de résolution du microscope électronique est d'environ 0,2 nm. En outre, cette résolution est encore diminuée du fait du mauvais contraste des échantillons biologiques ; dans ce cas, le pouvoir de discrimination pratique va de 1 à 2 nm. Bien que sans comparaison avec celle calculée d'après la longueur d'onde des électrons, cette valeur correspond cependant à un gain d'un facteur 100 au moins par rapport à la résolution du microscope optique.

Les biologistes utilisent deux types de microscopie électronique, la microscopie à transmission et la microscopie à balayage. En principe, la microscopie électronique à transmission est le pendant de l'observation d'échantillons colorés au microscope optique sur fond clair. On fixe l'échantillon et on lui donne un contraste à l'aide de sels de métaux lourds, qui donnent le contraste en diffractant les électrons. Le faisceau d'électrons traverse l'échantillon et est focalisé pour former une image sur un écran fluo-

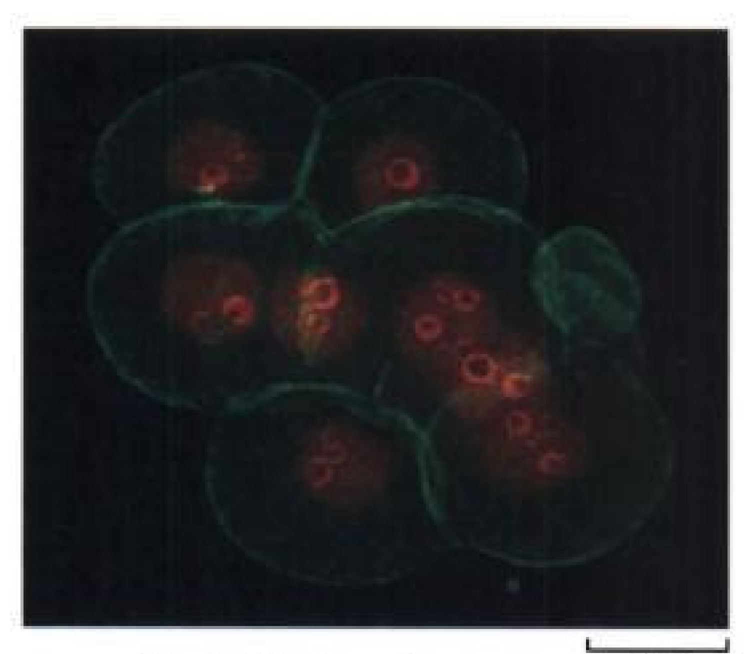


Figure 1.29
Micrographie confocale de cellules d'embryon de souris. Les noyaux sont colorés en rouge et les filaments d'actine soutenant la membrane plasmique en vert (Aimablement transmis par David Albertini, Tufts University School of Medicine).

rescent. Les électrons qui heurtent un atome lourd fixé sur l'échantillon sont réfractés et ne contribuent pas à la formation de l'image finale ; les régions colorées par les métaux lourds sont les régions sombres de l'image.

Les échantillons destinés à la microscopie électronique sont colorés soit positivement, soit négativement. Dans la coloration positive, on débite l'échantillon biologique en fines tranches, dont les lipides, les protéines et les acides nucléiques captent les métaux lourds (tétra-oxyde d'osmium, acétate d'uranyle, acétate de plomb) des solutions dans lesquelles on incube les tranches ; ces métaux lourds s'accumulent dans diverses structures cellulaires, qui apparaissent en sombre sur l'image finale (figure 1.30). D'autres méthodes de coloration positive arrivent à identifier certaines macromolécules au sein des cellules : des anticorps marqués par un métal lourd (des particules d'or, par exemple) servent à repérer, au microscope électronique, la localisation subcellulaire des protéines correspondantes ; cette méthode est le pendant de la microscopie à fluorescence à l'aide d'anticorps marqués par un groupe fluorescent.

On emploie surtout la coloration négative pour examiner les structures biologiques intactes, les bactéries, les organites isolés et les macromolécules (figure 1.31). Pour ce faire, on place l'échantillon biologique sur un film et on attend que les sels de métaux lourds se déposent sur le film autour de l'échantillon ; l'échantillon est ainsi coincé dans une pellicule de colorant impénétrable aux électrons et apparaît en clair sur un fond sombre.

L'**ombrage métallique** est une méthode qui met en évidence, grâce au microscope électronique à transmission, la surface des structures subcellulaires isolées ou des macromolécules (figure 1.32). On couvre l'échantillon d'un mince film d'atomes vaporisés sous vide à partir d'une électrode, de platine par exemple. Le métal est projeté de côté sur l'échantillon de sorte que les surfaces de celui-ci tournées vers l'électrode d'où s'échappent les atomes de métal seront plus contrastées que les autres. Ce contraste différentiel se manifeste par un effet d'ombre, qui montre l'échantillon en trois dimensions sur les microphotographies.

La méthode de **cryofracture**, couplée à l'ombrage, a profité notablement à l'étude de la structure des membranes. On plonge l'échantillon dans l'azote liquide (-196° C) et on le fracture à l'aide d'une lame de couteau ; souvent la ligne de fracture passe au centre de la bicouche lipidique de la membrane et révèle les faces internes de la membrane cellulaire (figure 1.33) ; en ombrant ensuite la préparation au platine, puis en détruisant le matériau biologique avec un acide, on obtient une réplique métallique de la surface de l'échantillon. Quand on examine ces répliques au microscope

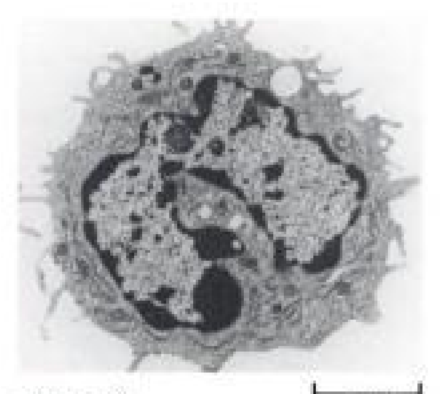


Figure 1.30
Coloration positive.
Micrographie électronique à transmission d'une coupe de globule blanc colorée positivement (Don W. Fawcett/Visuals Unlimited).

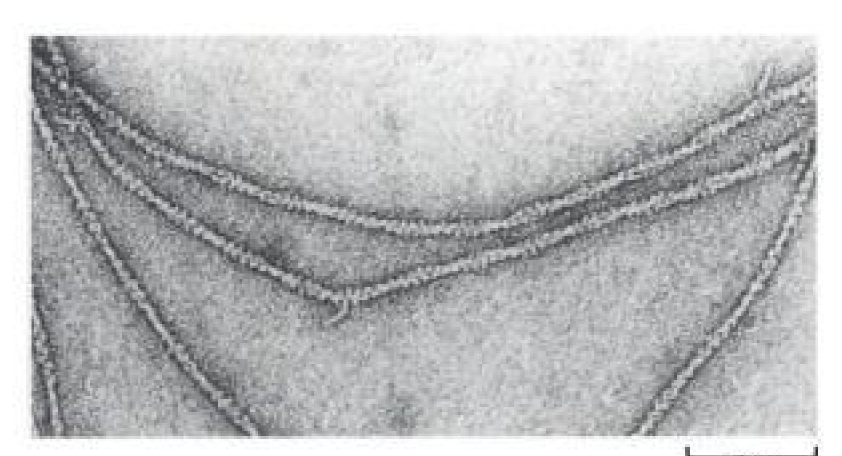


Figure 1.31
Coloration négative. Micrographie électronique à transmission de filaments d'actine coloré négativement (Aimablement communiqué par Roger Craig, University of Massachusetts Medical Center).

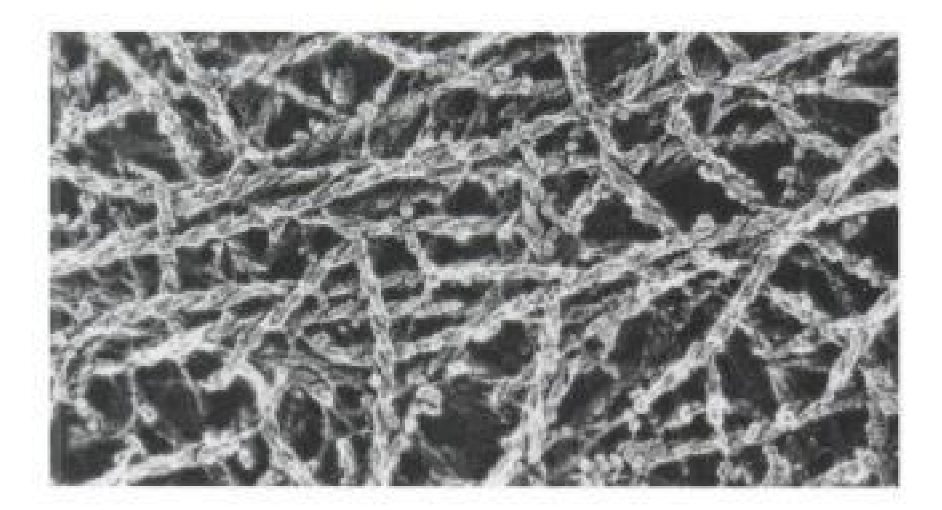
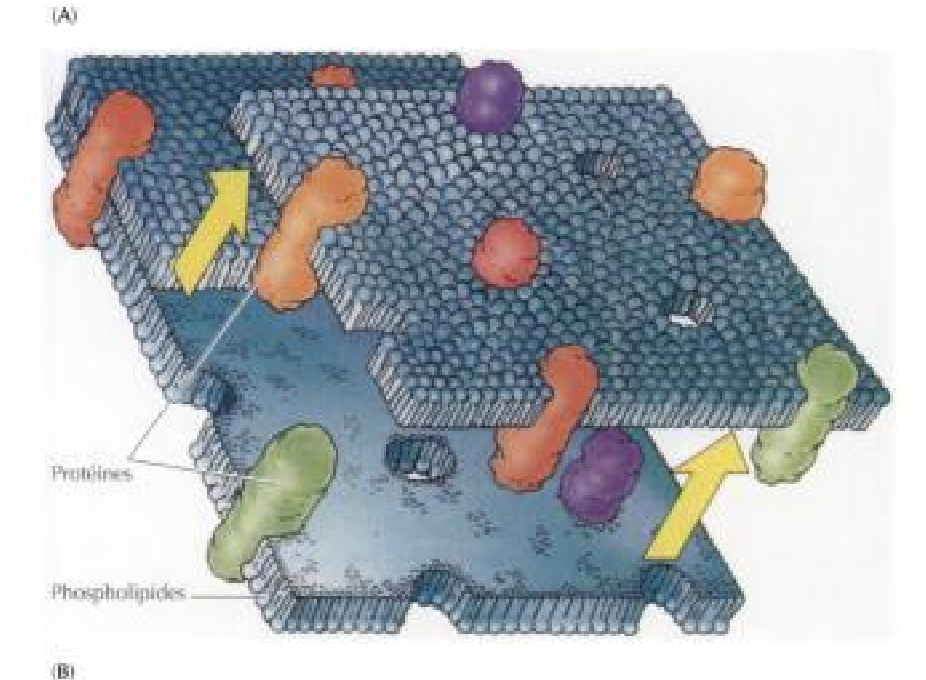


Figure 1.32
Objet ombré par un métal.
Micrographie électronique de filaments d'actine/myosine du cytosquelette ombrés par un métal (Don W. Fawcett, J. Heuser/Photo Researchers, Inc).

(A)



(B)

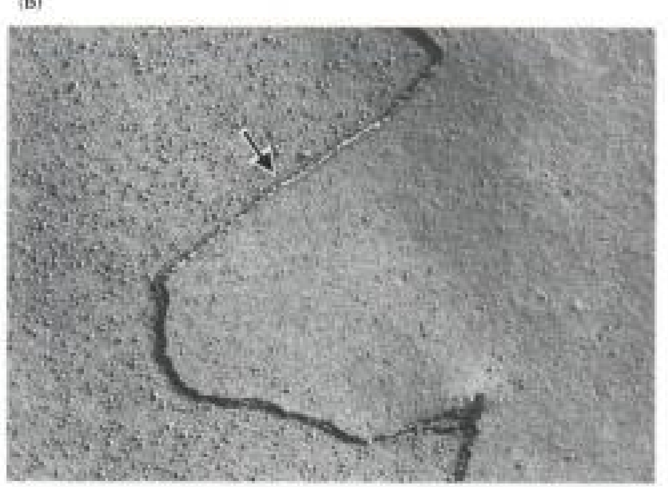
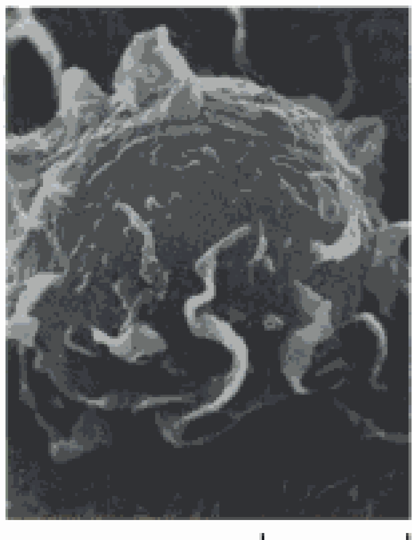


Figure 1.33
Cryofracture.
(A) La cryofracture fend la bicouche lipidique, en laissant les protéines membranaires intrinsèques enfouies dans l'un des deux feuillets.
(B) Micrographie, après cryofracture, des membranes de deux cellules adossées ; les protéines qui occupent la membrane de part en part apparaissent sous forme de particules intramembranaires (flèche) (Don W. Fawcett/PhotoResearchers, Inc).

Figure 1.34
Microscopie électronique à balayage. Micrographie électronique à balayage d'un macrophage (David Phillips/Visuals Unlimited).



électronique, on voit de petites proéminences qui représentent les protéines insérées dans le cœur de la membrane. Une variante de la cryofracture, le **cryodécapage**, permet de voir non seulement les faces intérieures d'une membrane, mais aussi ses faces extérieures.

L'autre type de microscopie électronique est la **microscopie électronique à balayage**, employée pour mettre en évidence le profil tridimensionnel d'une cellule (figure 1.34). Lors du balayage, le faisceau d'électrons ne traverse pas l'échantillon, mais se heurte à la couche d'atomes lourds dont on a enrobé l'échantillon ; les électrons diffractés ou émis par la surface de l'échantillon balayé par le faisceau sont capturés pour donner une image tridimensionnelle de la surface cellulaire. Comme le pouvoir de résolution de la microscopie électronique à balayage ne dépasse pas 10 nm, on réserve cette méthode à l'examen de cellules intactes, pas à celui des organites ou des macromolécules.

Séparation des éléments subcellulaires

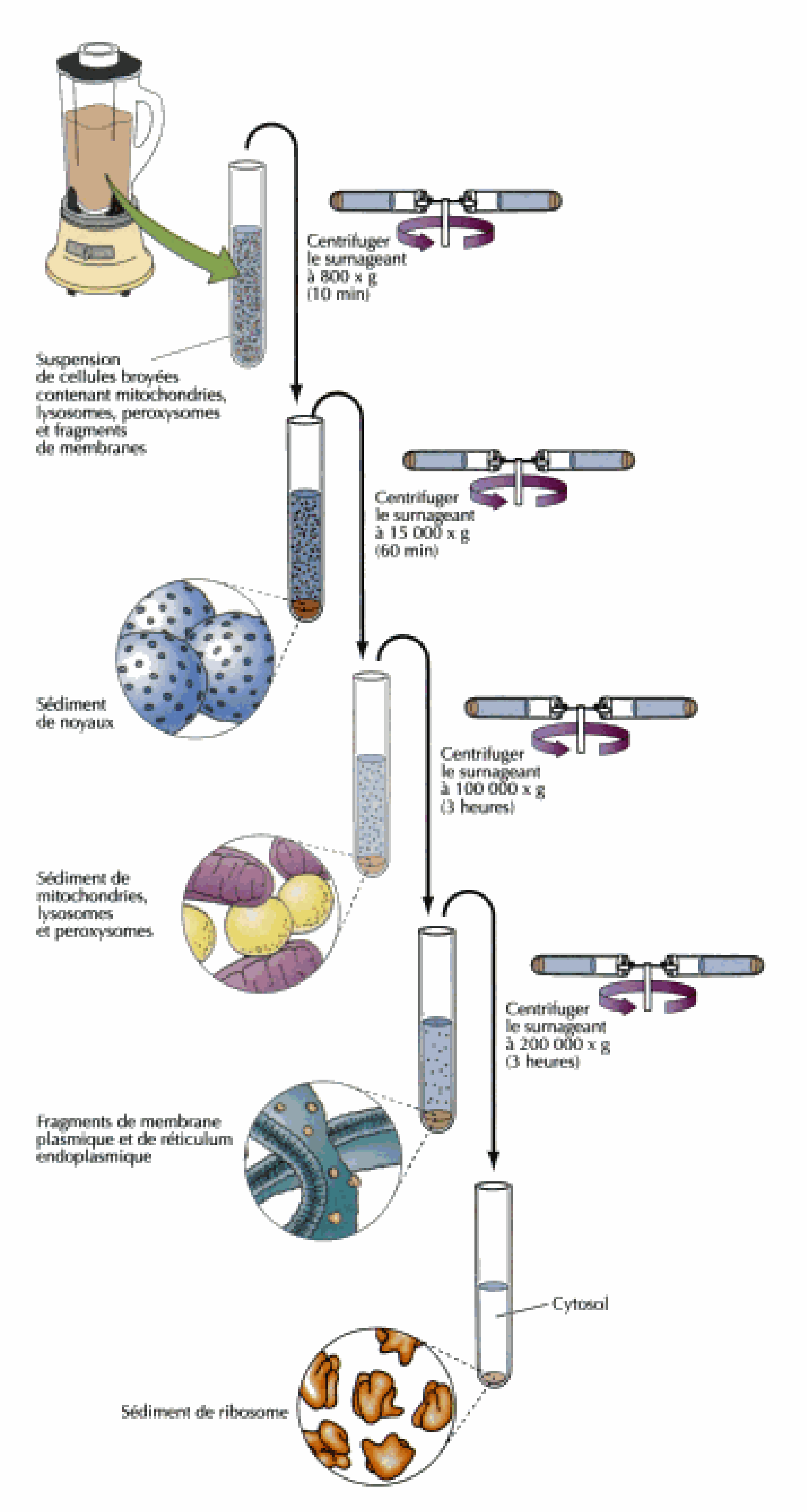
Si la microscopie électronique a révélé la structure fine de la cellule, elle n'a pas pu à elle seule indiquer le rôle joué par les divers constituants de la cellule eucaryote. Pour résoudre de nombreuses questions ayant trait aux organites des cellules eucaryotes, on a dû obtenir ces organites sous une forme propice aux recherches biochimiques. On y arrive par la **centrifugation différentielle**, méthode en grande partie mise au point par Albert Claude, Christian de Duve et leurs collaborateurs, au cours des années '40 et '50, dans le but de séparer les composants cellulaires selon la taille et la densité.

On commence par rompre la membrane cellulaire en choisissant des conditions qui respectent les constituants du cytoplasme cellulaire, par exemple en soumettant les cellules à des ultrasons (sons de haute fréquence) ou à un broyage mécanique manuel ou à l'aide d'un homogénéiseur à haute vitesse. Toutes ces méthodes rompent la membrane plasmique et le réticulum endoplasmique en petits fragments et respectent les autres constituants (noyau, lysosomes, peroxysomes, mitochondries et chloroplastes).

On fractionne ensuite ce mélange de constituants cellulaires (appelé lysat ou homogénat) *via* une série de centrifugations dans une **ultracentrifugeuse** qui, à des vitesses élevées (jusqu'à 100 000 tours par minute) développe des forces atteignant 500 000 fois la gravité terrestre. Cette force entraîne les composants cellulaires vers le bas du tube à centrifuger, pour en former un culot (un processus appelé sédimentation), d'autant plus vite que leur taille ou leur densité ou les deux sont plus grandes (figure 1.35). On commence par centrifuger l'homogénat à vitesse réduite, pour sédimenter les cellules restées intactes et les composants les plus grands (noyau) ; on trouvera dans le sédiment une fraction enrichie en noyaux et, dans le surnageant, tous les autres composants cellulaires. On centrifuge alors ce dernier à vitesse plus élevée, de façon à sédimenter mitochondries, chloroplastes, lysosomes et peroxysomes. Le surnageant obtenu est recentrifugé à très grande vitesse, de façon à sédimenter les fragments de membrane plasmique et de réticulum endoplasmique. À vitesse encore plus élevée, une quatrième centrifugation sédimentera les ribosomes, en laissant dans le surnageant la fraction soluble du cytoplasme (le cytosol).

Les fractions recueillies d'une centrifugation différentielle sont enrichies en un type particulier d'organite, mais sont loin d'être pures. On les purifie

Figure 1.35
Fractionnement des éléments d'un broyat de cellules. On lyse des cellules et on en sépare les constituants par une série de centrifugations à vitesse croissante. Après chaque centrifugation, on récupère dans le culot les organites qui ont sédimenté et on recentrifuge le surnageant à plus grande vitesse, de façon à sédimenter les organites de taille juste inférieure. (g = la force de gravitation de la Terre).



ensuite par **centrifugation en gradient de densité**, une méthode dans laquelle les organites se séparent par sédimentation à travers un gradient très dense, comme une solution concentrée de saccharose.

Dans la **centrifugation zonale,** on dépose le mélange initial sur un gradient de saccharose (figure 1.36) ; les particules migrent d'autant plus vite qu'elles sont plus volumineuses, sous forme de bandes bien distinctes. Une fois les constituants séparés, on récolte les fractions du gradient, dans lesquelles on trouve, bien séparés, les organites de même taille (par exemple, mitochondries, lysosomes et peroxysomes).

La **centrifugation à l'équilibre** dans un gradient de densité sert à séparer les composants cellulaires selon leur densité de flottaison, quelle que soit leur forme ou leur taille. Ici, on centrifuge l'échantillon dans un gradient constitué de saccharose ou de chlorure de césium en concentration élevée : les particules ne se séparent pas selon leur vitesse de sédimentation car on prolonge la centrifugation jusqu'à ce que les diverses particules atteignent la position d'équilibre, celle où leur propre densité de flottaison égale la densité de la solution de saccharose ou de chlorure de césium. Cette

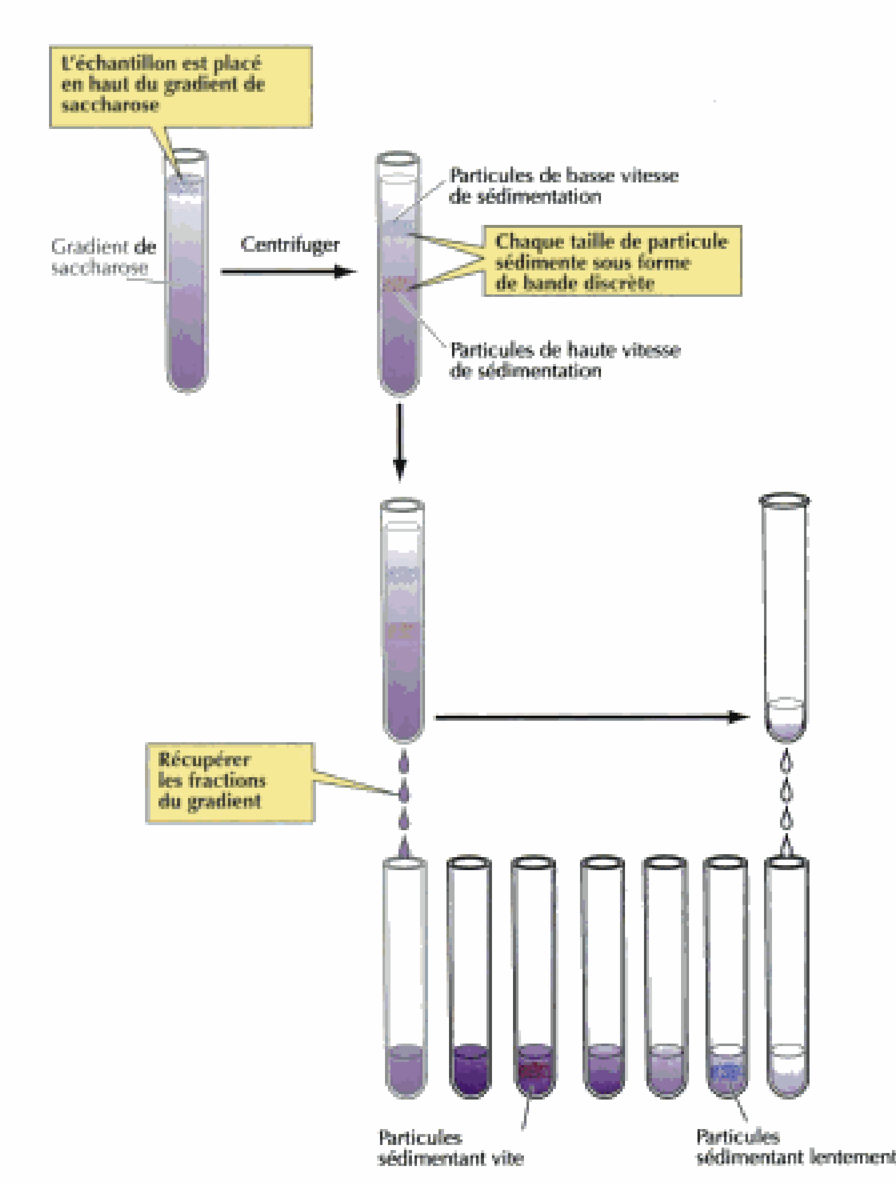


Figure 1.36
Centrifugation zonale en gradient de densité. On place l'échantillon au sommet d'un gradient de saccharose ; les types de particules sédimentent en bandes nettes, selon leur taille. Pour récupérer chaque type dans un récipient, il suffit de trouer le fond du tube à centrifuger et de laisser les gouttes s'écouler.

méthode permet de séparer l'un de l'autre divers types de membranes et est assez sensible pour séparer des macromolécules marquées par des isotopes différents d'un même atome. ; l'exemple classique est celui (voir chapitre 3) qui a mis en évidence la façon dont se réplique l'ADN : les molécules d'ADN composées de l'isotope léger (^{14}N) ou de l'isotope lourd (^{15}N) de l'azote se séparent nettement par centrifugation à l'équilibre dans un gradient de chlorure de césium.

Culture de cellules animales in vitro

On étudie facilement les cellules pour autant qu'on puisse les faire pousser et les manipuler aisément au laboratoire ; bien que ce soit une tâche moins aisée que de cultiver des bactéries ou des levures, on a réussi à cultiver certaines cellules animales et végétales. Les procédés de culture *in vitro* ont permis au biologiste d'étudier la prolifération cellulaire ainsi que d'effectuer les manipulations génétiques nécessaires à la compréhension de la structure et de la fonction des gènes.

Pour mettre des cellules animales en culture, on commence par dissocier un fragment tissulaire en une suspension de ses composants cellulaires, que l'on transfère dans une boîte de culture remplie de milieu nutritif. La plupart des types de cellules animales, comme les fibroblastes et les cellules épithéliales, s'attachent et se divisent à la surface du plastic des boîtes de culture (figure 1.37). Pour disposer de cellules en prolifération rapide, on prélève souvent des fragments d'embryon ou de tumeur ; comme les fibroblastes embryonnaires croissent particulièrement bien en culture, ils sont un des types de cellules le plus étudiés au laboratoire. Dans des milieux de culture bien choisis, on arrive cependant à faire pousser des cellules de type spécialisé, ce qui permet de connaître leur comportement dans de strictes conditions expérimentales.

Les milieux mis au point pour cultiver les cellules animales sont beaucoup plus complexes que les milieux « minimum » suffisants à la prolifération des bactéries et des levures. Les premières tentatives de culture de cellules utilisaient des milieux de composition incertaine, comme le plasma, le sérum et des extraits embryonnaires. Une avancée majeure eut lieu en 1955, quand Harry Eagle décrivit le premier milieu reconstitué dans lequel les cellules animales poussaient bien. Outre des sels et du glucose, les milieux de culture pour cellules animales contiennent divers acides aminés et vitamines que la cellule ne synthétise pas elle-même. Les milieux optimaux pour cellules animales contiennent en plus du sérum, où les cellules puisent les facteurs de croissance polypeptidiques qui activent leur division. On a identifié plusieurs de ces facteurs ; ce sont des régulateurs clés de la prolifération et de la différenciation cellulaires, qui servent de signaux de communication entre les cellules des organismes pluricellulaires. Ainsi, un rôle important des fibroblastes cutanés d'un animal est de se mettre à proliférer quand il faut réparer une coupure ou une contusion. Leur division est amorcée sous l'effet d'un facteur de croissance libéré par les plaquettes au moment de la coagulation sanguine, ce qui active la prolifération des fibroblastes au voisinage de la lésion. L'identification d'un grand nombre de facteurs de croissance permet de cultiver de nombreux types de cellules dans des milieux dépourvus de sérum, c'est-à-dire dans lesquels on a remplacé le sérum par l'un ou l'autre facteur de croissance particulier au type de cellule étudiée.



Figure 1.37
Culture de cellules animales. Micrographie électronique à balayage de fibroblastes humains ancrés à la surface d'une boîte de culture (David Phillips/Visuals Unlimited).

EXPÉRIENCE CLÉ



Culture de cellules animales

Nutrition needs of mammalian cells in culture
Harry Eagle
National Institutes of Health, Bethesda, Md
Science 122 (1955), 501-504



Harry Eagle

Contexte

Les premières cultures de cellules s'effectuaient en laissant les cellules se diviser à partir de fragments de tissus enrobés dans du plasma coagulé, un système mal adapté à l'expérimentation. À la fin des années '40, on assista à une percée notable, car on put établir des lignées à partir de cellules ancrées à la surface de boîtes de culture ; ces lignées poussaient cependant dans des milieux mal définis, consistant en des mélanges, en proportion variable, de sérum et d'extraits embryonnaires. En 1952, fut établie, par exemple, la lignée bien connue de cellules cancéreuses humaines (cellules HeLa), dans un milieu composé de plasma de poulet, d'extrait d'embryon bovin et de sérum de sang du cordon humain. Des milieux de culture aussi complexes et mal définis empêchaient qu'on trouve les exigences nutritionnelles propres aux cellules animales. Le premier à résoudre ce problème fut Harry Eagle, quand il se mit à tester systématiquement toutes les substances nutritives indispensables à la prolifération des cellules animales en culture.

Preuve expérimentale

Eagle faisait pousser deux lignées de cellules déjà établies, les cellules HeLa et la lignée L de fibroblastes de souris ; ces lignées exigeaient un milieu composé de sels, de glucides, d'acides aminés et de vitamines, auquel il ajoutait des protéines sériques. En faisant varier systématiquement les composants de son milieu, Eagle parvint à trouver quels étaient les nutriments indispensables à la prolifération de ses cellules. Outre des sels et du glucose, il fallait 13 acides aminés et plusieurs vitamines, ainsi qu'une faible concentration de protéines sériques. La composition du milieu de base, dit milieu de Eagle, est donnée dans le tableau ci-contre, repris de sa publication de 1955.

Portée de la découverte

Le milieu mis au point par Eagle sert encore à présent de milieu de base pour cultiver les cellules animales. À partir de ces données, les biologistes sont arrivés à faire pousser tout une série de cellules dans des conditions expérimentales précises ; ceci fut une étape critique avant qu'on puisse étudier la prolifération et la différenciation des cellules animales et identifier les facteurs de croissance présents dans les sérum — on sait que ce sont des polypeptides qui commandent le comportement de chaque cellule au sein de l'organisme animal.

Tableau 4 Milieu minimal pour la culture des cellules HeLa et des fibroblastes de souris (10)

Acides aminés L* (mM)			Vitamines‡ (mM)		Autres	
Arginine	0,1		Biotine	10^{-3}	Glucose	5 mM§
Cystine	0,05	(0,02)†	Choline	10^{-3}	Pénicilline	0,005 %#
Glutamine	2,0	(1,0)†	Acide folique	10^{-3}	Streptomycine	0,005 %#
Histidine	0,05	(0,02)†	Nicotinamide	10^{-3}	Rouge phénol	0,0005 %#
Isoleucine	0,2		Pantothénate	10^{-3}		
Leucine	0,2	(0,1)†	Pyridoxal	10^{-3}		
Lysine	0,2	(0,1)†	Thiamine	10^{-3}	Pour étudier les nutriments	
Méthionine	0,05		Riboflavine	10^{-4}	Sérum de cheval dialysé, 1 %†	
Phénylalanine	0,1	(0,05)†			Sérum humain dialysé, 5 %	
Thréonine	0,2	(0,1)†	Sels (mM)			
Tryptophane	0,02	(0,01)†			Pour les solutions mères	
Tyrosine	0,1				Sérum de cheval entier, 5 %	
Valine	0,2	(0,1)†	NaCl	100	Sérum humain entier, 10 %	
			KCl	5		
			$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	1		
			$NaHCO_3$	20		
			$CaCl_2$	1		
			$MgCl_2$	0,5		

* À garder au réfrigérateur sous forme de solution mère à 20 fois la concentration indiquée.
† Pour les fibroblastes de souris.
‡ Conserver congelée sous forme de solution mère globale contenant 100 ou 1000 fois les concentrations indiquées.
§ Conservés au réfrigérateur sous forme de deux solutions, la première contenant NaCl, KCl, NaH_2PO_4, $NaHCO_3$ et le glucose à 10 fois la concentration indiquée pour chacun, la seconde contenant $CaCl_2$ et $MgCl_2$ à 20 fois la concentration indiquée.
|| Conserver congelée sous forme de solution mère à 100 fois.
\# Conserver sous forme de solution mère contenant 100 fois la concentration indiquée de pénicilline, streptomycine et rouge phénol.

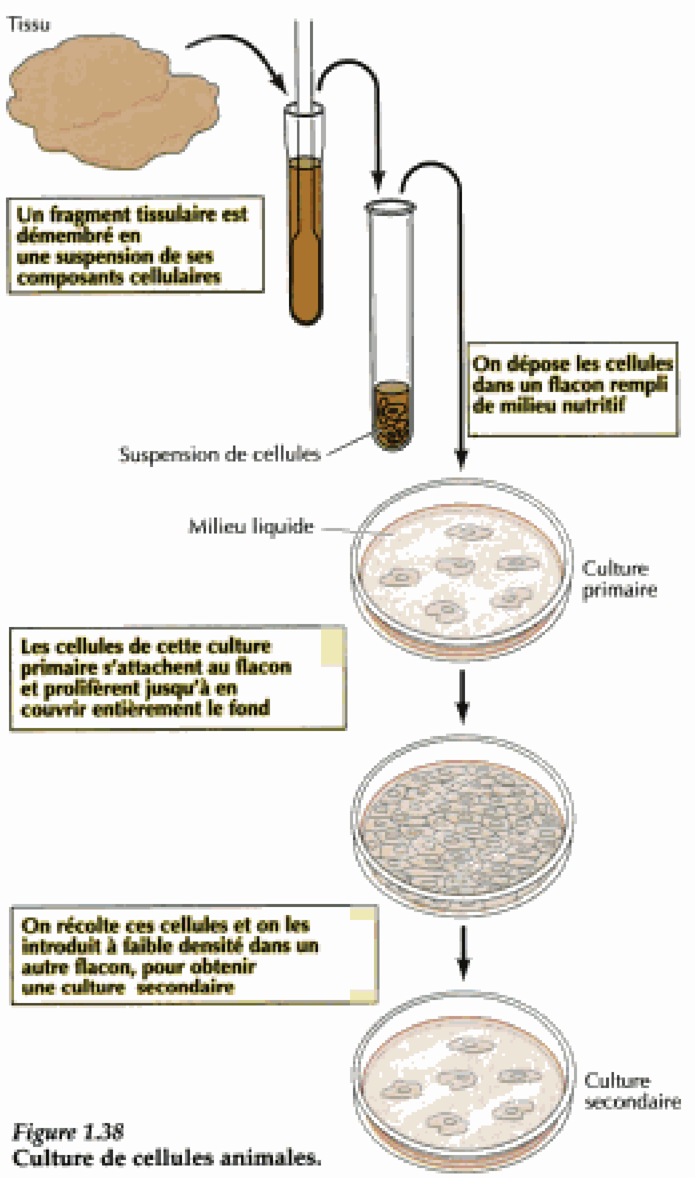


Figure 1.38
Culture de cellules animales.

Les cultures de cellules issues du prélèvement direct sur un tissu sont des **cultures primaires** (figure 1.38) ; les cellules d'une culture primaire poussent habituellement jusqu'à ce qu'elles couvrent complètement la surface de la boîte de culture ; on peut les récolter et les resuspendre à faible densité pour obtenir des cultures secondaires. Ce processus est reproductible de nombreuses fois, mais la plupart des cellules normales vont finir par ne plus se reproduire ; ainsi les fibroblastes humains normaux se reproduiront de 50 à 100 fois, puis deviendront quiescents avant de mourir. Par contre, les cellules dérivées d'une tumeur prolifèrent en général indéfiniment en culture ; aussi les appelle-t-on **lignées cellulaires immortelles**. En outre, plusieurs lignées immortalisées de cellules de rongeurs ont été isolées à partir de culture de fibroblastes normaux ; au lieu de se mettre au repos avant de mourir, certaines cellules de ces cultures continuent de proliférer indéfiniment, formant des lignées cellulaires rappelant celles qu'on isole à partir d'une tumeur. Ces lignées immortalisées se sont révélées utiles dans beaucoup d'expériences car elles sont une source inépuisable et reproductible de cellules que l'on peut manipuler, cloner et faire pousser indéfiniment au laboratoire.

Même dans les meilleures conditions, les cellules animales en prolifération active mettent environ 20 heures pour se reproduire, soit dix fois plus qu'un levure. Ceci rend les expériences sur les cellules animales plus difficiles et plus lentes que celles qu'on effectue sur des bactéries et des levures ; ainsi, pour voir une colonie issue d'une seule cellule animale, il faut attendre au moins une semaine, alors qu'une colonie de bactéries ou de levures apparaît en une nuit. Cela n'a pas empêché les biologistes d'effectuer des manipulations génétiques sur les cellules animales en culture, dans le but de comprendre la structure et le fonctionnement de la cellule.

Culture de cellules végétales

On a appris aussi à cultiver des cellules végétales dans des milieux enrichis en facteurs de croissance bien choisis. Contrairement aux facteurs de croissance polypeptidiques qui commandent la prolifération de la plupart des cellules animales, les facteurs de croissance végétaux sont de petites molécules qui traversent la paroi cellulaire des végétaux. En présence d'un mélange approprié de ces facteurs de croissance, beaucoup de types de cellules végétales prolifèrent en culture, en donnant une masse indifférenciée de cellules, appelée cal (figure 1.39).

Un trait frappant des cellules végétales, qui diffère nettement du comportement des cellules animales, est qu'elles sont **totipotentes**. Toute cellule animale différenciée, comme un fibroblaste, ne donnera jamais un autre type cellulaire, par exemple un neurone. Cependant, la plupart des cellules végétales sont capables de donner tous les types de cellules et de tissus requis pour reformer une plante entière. Aussi, en choisissant le mélange



Figure 1.39
Culture de cellules végétales. Masse de cellules végétales indifférenciées croissant sur un milieu solide (John N. A. Lott/Biological Photo Service).

approprié de substances nutritives et de facteurs de croissance, peut-on inciter des cellules végétales indifférenciées à former divers tissus végétaux, parmi lesquels des racines, des tiges et des feuilles ; à partir d'une seule cellule en culture, on arrive souvent à régénérer même une plante entière. À part son intérêt théorique, ce pouvoir qu'a une cellule isolée, manipulée en culture, de générer une plante complète permet au botaniste d'introduire des modifications génétiques dans les plantes, clé d'importantes applications de l'ingénierie génétique à l'agriculture.

Virus

Un virus est un parasite intracellulaire incapable de se reproduire par lui-même ; il se reproduit en infectant un hôte dont il s'approprie la machinerie cellulaire pour produire des descendants. Les virus les plus simples comportent un acide nucléique génomique (ADN ou ARN) enrobé d'un manteau de protéines (figure 1.40). Les virus sont d'importants sujets d'étude pour la biologie moléculaire et cellulaire parce qu'ils offrent des systèmes simplifiés pour élucider les fonctions cellulaires. Comme la réplication d'un virus dépend du métabolisme de la cellule qu'il infecte, l'étude d'un virus a révélé maints aspects fondamentaux de la biologie cellulaire. L'étude des virus bactériens a contribué notablement à nous révéler les mécanismes de base de la génétique moléculaire, et les expériences menées sur un virus végétal (celui de la mosaïque du tabac) montrèrent pour la première fois le potentiel génétique d'un ARN. Les virus animaux sont devenus des sondes particulièrement sensibles dans la découverte des diverses activités de la cellule eucaryote.

La prolifération rapide des bactéries et la petite taille de leur génome en font d'excellents sujets d'expérience en biologie moléculaire et les virus bactériens (**bactériophages**) ont facilité l'étude de la génétique bactérienne. Un des bactériophages les plus importants est T4, qui infecte *E. coli* et s'y réplique ; après entrée d'une seule particule de T4, il ne faut que 20 à 30 minutes pour que la cellule contienne 200 particules filles, après quoi elle éclate (lyse) et libère dans le milieu de culture les particules qui vont infecter d'autres cellules. Dans une culture de bactéries sur agar, la réplication de T4 aboutit à la formation de zones claires (les cellules lysées, appelées plages) sur le tapis de bactéries (figure 1.41). S'il est facile de faire proliférer des particules virales infectieuses et de les soumettre à l'expérimentation, il est aussi facile d'isoler des mutants, par exemple des virus capables de proliférer sur une souche donnée de *E. coli*, mais par sur une autre souche ; il est donc encore plus facile de manipuler T4 pour des expériences de génétique moléculaire que de manipuler *E. coli*, d'ailleurs aussi parce

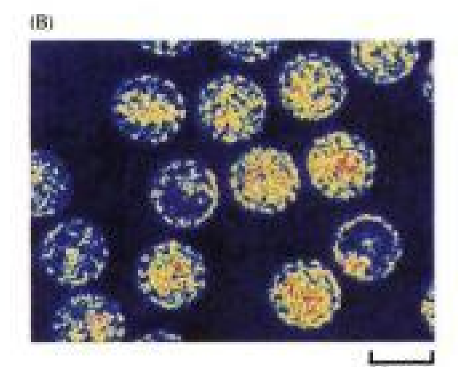
Figure 1.40
Structure d'un virus animal.
(A) Virion du papillome contenant une petite molécule d'ADN fermée sur elle-même, enrobée dans un manteau protéique (capside). (B) Micrographie électronique de particules de virus du papillome humain, contrastées par traitement d'images (Alfred Pasieka/Science Photo Library/Photo Researchers, Inc).

(A)

ADN

Protéines de capside

(B)



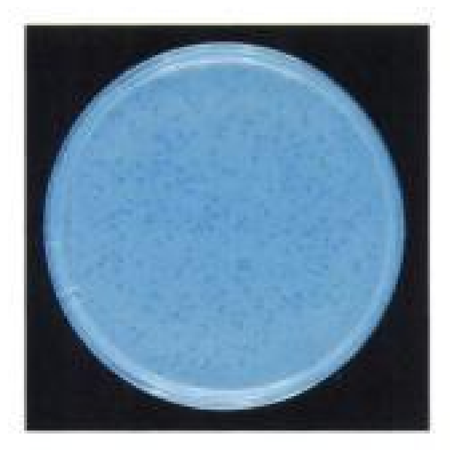


Figure 1.41
Plages de bactériophage. On voit des plages de bactériophage T4 sur un lit de E. coli ; chacune provient de la réplication d'une unique particule virale (E. C. S. Chen/Visuals Unlimited).

que le génome de T4 est 20 fois plus petit que celui de *E. coli*, soit environ 0,2 millions de paires de bases. D'autres bactériophages ont un génome encore plus restreint, le plus petit de ceux qu'on connaît comptant seulement environ 3 600 nucléotides. Les virus bactériens ont donc fourni des systèmes expérimentaux de choix aux généticiens moléculaires : c'est ce qui a permis à ceux-ci d'élucider maints principes fondamentaux de la biologie moléculaire.

À cause de la complexité accrue des génomes animaux, les virus furent encore plus importants pour les expériences sur les cellules animales que pour les expériences sur les bactéries. Beaucoup de virus animaux se répliquent en culture de cellules et on peut les doser en comptant les plages formées dans la couche de cellules, comme on le fait pour les bactériophages ; en outre, les génomes des virus animaux ne sont pas plus complexes que ceux des virus bactériens (de 3 000 à 300 000 paires de bases) ; il est donc bien plus facile de les manipuler que de manipuler le génome de leur cellule hôte.

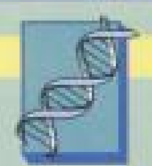
Il existe de nombreuses espèces de virus animaux, dont le matériau génétique est soit de l'ADN, soit de l'ARN (tableau 1.3). Un groupe de virus animaux, les **rétrovirus**, ont un génome constitué d'ARN dans les virions, mais synthétisent une copie ADN de ce génome dans la cellule infectée. C'est en fait un bel exemple de la valeur des virus comme modèle, puisque c'est en étudiant les rétrovirus qu'on a découvert la synthèse d'ADN sur une matrice d'ARN, une façon remarquable de transférer l'information génétique qui existe tant chez les procaryotes que chez les eucaryotes. La réplication d'ADN, la transcription, la maturation des ARN ainsi que le transport et la sécrétion des protéines sont d'autres domaines où les virus animaux furent de précieux modèles pour l'étude de leur cellule hôte.

Il est remarquable que l'infection d'une cellule normale par certains virus ne tue pas la cellule, mais la transforme en cellule cancéreuse. L'étude de ces virus cancérogènes, décrits d'abord par Peyton Rous en 1911, fut non seulement à la base de notre compréhension de la biologie cellulaire et moléculaire du cancer, mais aussi la percée qui mena aux mécanismes moléculaires qui pilotent la prolifération et la différenciation des cellules animales.

Tableau 1.3 Exemples de virus animaux

Famille de virus	Membre représentatif	Taille du génome (en millier de paires de bases)
Génomes à ARN		
Picornavirus	Virus de la polyomyélite	7-8
Togavirus	Virus de la rubéole	12
Flavivirus	Virus de la fièvre jaune	10
Paramyxovirus	Virus des oreillons	16-20
Orthomyxovirus	Virus de la grippe	14
Rétrovirus	VIH	9
Génomes à ADN		
Hepadnavirus	Virus de l'hépatite B	3,2
Papovavirus	Virus du papillome humain	5-8
Adénovirus	Virus de l'adénome	36
Herpesvirus	Virus de l'herpes simplex	120-200
Poxvirus	Virus de la vaccine	130-280

MÉDECINE MOLÉCULAIRE



Virus et cancer

Pathogénie

Cancer est le nom de famille d'une série de pathologies caractérisées par une prolifération anarchique de cellules. Toute cellule normale d'un organisme se divise de façon appropriée aux besoins de l'ensemble des cellules de l'organisme ; par contre, les cellules cancéreuses poussent en échappant à toute régulation, pour envahir les autres tissus et organes et mettre en péril leur fonctionnement. Après les maladies cardiovasculaires, le cancer est la deuxième cause de décès aux États-Unis ; un américain sur trois sera atteint d'un cancer à un moment de sa vie et, malgré les grands progrès thérapeutiques, près d'un américain sur quatre finira par en mourir. Le but des médecins est donc de comprendre le processus de cancérisation et de mettre au point des méthodes plus efficaces pour le guérir.

Bases moléculaires et cellulaires

On sait à présent que le cancer est dû à des mutations de gènes qui commandent la prolifération normale des cellules. La grande découverte qui a permis d'identifier ces gènes a pour origine l'étude de virus responsables du cancer chez les animaux, dont le prototype fut isolé par Peyton Rous en 1911. Ce biologiste remarqua que le sarcome (cancer du tissu conjonctif) du poulet était transmis par un virus, connu à présent sous le nom de virus du sarcome de Rous (RSV, en anglais). Comme le RSV est un rétrovirus dont le génome ne comporte que 10 000 paires de bases, son étude au plan moléculaire est plus facile que celle des génomes complexes des cellules de poulet et d'autres animaux. Ces travaux aboutirent à l'identification d'un gène singulier, responsable de cancer (oncogène), porté par le virus, puis à la découverte de gènes apparentés dans les cellules normales de toutes les espèces de vertébrés, y compris l'Homme. On sait maintenant que certains cancers humains sont liés à des virus ; les autres sont dus à des mutations de gènes cellulaires normaux similaires à l'oncogène initial découvert chez RSV.

Prévention et traitement

Les cancers de l'Homme causés par des virus sont le cancer du col utérin et de la région anogénitale (virus des papillomes), le cancer du foie (virus de l'hépatite B) et certains types de lymphomes (virus d'Epstein-Barr et virus lymphotrope T humain). À l'ensemble de ces virus, on attribue environ 20 % de l'incidence mondiale de cancers. La vaccination devrait en principe protéger contre ces virus ; on a réalisé un grand progrès puisqu'on dispose d'un vaccin très efficace contre le virus de l'hépatite B. D'autres cancers de l'Homme sont dus à des mutations de gènes cellulaires normaux, mutations non pas de nature congénitale, mais acquises pour la plupart au cours de la vie de l'individu. L'étude des virus cancérogènes a mené à l'identification d'une bonne partie des gènes responsables de cancers d'origine non virale et nous a fait saisir les mécanismes moléculaires en jeu dans l'apparition des cancers. Biologistes et oncologistes travaillent à présent d'arrache-pied pour appliquer ces concepts de biologie moléculaire et cellulaire du cancer à la mise au point de traitements anticancéreux.

Référence

Rous, P. 1911. A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. J. Exp. Med. 13 :397-411.



Vue de la tumeur transplantable dont Rous isola le virus du sarcome.

TERMES CLÉ

cellule de procaryote (ou procaryotique), cellule d'eucaryote (ou eucaryotique), monde de l'ARN, phospholipide, amphipathique, hydrophobe, hydrophile

adénosine 5'-triphosphate (ATP), glycolyse, photosynthèse, métabolisme oxydant (ou oxydatif)

archaebactérie, eubactérie, cyanobactérie, *Escherichia coli* (*E. coli*), paroi cellulaire, membrane plasmique, ribosome

noyau, mitochondrie, chloroplaste, lysosome, peroxysome, vacuole, réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, cytosquelette, endosymbiose

levure, *Saccharomyces cerevisiae*, pseudopode, cellule du parenchyme, cellule du collenchyme, cellule du sclérenchyme, cellule épidermique, cellule épithéliale, fibroblaste, érythrocyte, granulocyte, monocyte, macrophage, lymphocyte, neurone

Dictyostelium discoideum

***Caenorhabditis elegans*, cellule somatique, cellule germinale**

Drosophila melanogaster

Arabidopsis thaliana

***Xenopus leavis* (xénope), souris transgénique**

Résumé

ORIGINE ET ÉVOLUTION DES CELLULES

La cellule primordiale : Les cellules d'aujourd'hui, tant procaryotes que eucaryotes, descendent d'un unique ancêtre commun, sensé être apparu à une époque située entre 3,8 et 3,5 milliards d'années, par enrobage d'ARN autoréplicatif dans une membrane phospholipidique.

Évolution du métabolisme : Les premières réactions fournissant de l'énergie métabolique ressemblaient à une glycolyse anaérobie ; suivirent la photosynthèse, puis le métabolisme oxydant.

Procaryotes d'aujourd'hui : On divise les procaryotes contemporains en deux groupes, les archaebactéries et les eubactéries, séparées l'un de l'autre au début de l'évolution.

Cellules eucaryotes : Les cellules d'eucaryotes, plus grandes et plus complexes que celles de procaryotes, contiennent un noyau, des organites cytoplasmiques et un cytosquelette ; elles seraient issues d'une association avec des procaryotes.

Apparition des organismes pluricellulaires : Les eucaryotes les plus simples sont unicellulaires, comme les levures et les amibes. Les eucaryotes pluricellulaires proviennent d'associations entre eucaryotes unicellulaires, suivies d'une répartition du travail entre diverses sortes de cellules spécialisées, nées d'une différenciation qui a donné les plantes et les animaux contemporains.

TYPES CELLULAIRES CHOISIS COMME MODÈLES EXPÉRIMENTAUX

E. coli : À cause de leur simplicité génétique et de la facilité avec laquelle on les manipule, des bactéries comme E. coli sont propices aux recherches sur les aspects fondamentaux de la biochimie et de la biologie moléculaire.

Levures : En tant que eucaryotes les plus rudimentaires, les levures sont d'importants modèles pour l'étude de plusieurs aspects de la biologie des eucaryotes.

Dictyostelium discoideum : Cet eucaryote unicellulaire sert beaucoup dans les recherches sur la motilité cellulaire.

Caenorhabditis elegans : Le nématode *C. Elegans* est un organisme pluricellulaire simple servant de modèle à l'étude de l'embryogenèse.

Drosophila melanogaster : Vu les résultats de l'examen exhaustif de sa génétique, la drosophile a contribué notablement aux percées majeures dans le domaine de l'embryologie chimique.

Arabidopsis thaliana : On utilise volontiers cette petite arabette à fleur comme modèle dans les recherches sur la biologie moléculaire et le développement embryonnaire des végétaux.

Vertébrés : On cultive beaucoup de types de cellules de vertébrés, de façon à les étudier dans des conditions bien définies. Certains types de cellules spécialisées, comme les neurones et les myocytes, sont des modèles de choix pour étudier certains aspects de la biologie cellulaire. La grenouille Xenopus leavis sert de modèle dans les études du développement embryonnaire précoce des vertébrés et la souris est une espèce de mammifère appropriée aux études de génétique.

OUTILS DE LA BIOLOGIE CELLULAIRE

Microscopie optique : Toute une série d'instruments existent pour observer les cellules et les structures infracellulaires, ainsi que pour localiser certaines molécules au sein de la cellule à l'aide du microscope optique.

pouvoir de résolution, microscope à champ clair, microscope à contraste de phase, microscope à contraste d'interférence différentielle, microscopie à contraste d'interférence différentielle accentué par vidéo, microscope à fluorescence, microscope confocal

Microscopie électronique : Le microscope électronique, cent fois plus puissant que le microscope optique, sert à examiner les détails de la structure cellulaire.

microscopie électronique à transmission, contraste par écran métallique (ombrage métallique), cryofracture, cryodécapage, microscope électronique à balayage

Fractionnement des composants cellulaires : Divers types de centrifugation permettent d'isoler les organites des cellules eucaryotes pour y effectuer des études de biochimie.

centrifugation différentielle, ultracentrifugeuse, centrifugation en gradient de densité, centrifugation zonale, centrifugation à l'équilibre

Culture de cellules animales en flacon : La prolifération des cellules animales in vitro a fait progresser l'étude des mécanismes qui commandent la prolifération des cellules et leur différenciation.

cultures primaires, lignée cellulaire immortalisée

Culture de cellules végétales in vitro : Les cellules végétales cultivées in vitro se différencient en une série de types cellulaires, qui régénèrent parfois une plante entière.

caractère totipotent

Virus : Les virus sont des modèles rudimentaires propices à l'étude du fonctionnement des cellules.

bactériophage, rétrovirus

QUESTIONNAIRE

1. Pourquoi le règne de la photosynthèse a-t-il favorisé l'apparition consécutive du métabolisme oxydant ?

2. Les levures ont souvent servi de modèle pour étudier maints aspects de la biologie des cellules d'eucaryotes. Pourquoi ne conviennent-elles pas pour étudier la motilité des cellules animales ?

3. Quelle est la résolution atteinte par un microscope optique quand l'air, et non l'huile, sépare l'objet de l'objectif, en supposant que la longueur d'onde de la lumière visible est de 0,5 µm.

4. Vous désirez séparer deux organites de même densité de flottaison mais de taille différente. Allez-vous utiliser, en gradient de densité, la centrifugation zonale ou la centrifugation à l'équilibre ?

5. L'avantage du bactériophage T4 dans l'étude de la génétique moléculaire est que son génome est 20 fois plus petit que celui de E. coli. Combien de fois le génome du virus du sarcome de Rous est-il plus petit que celui de son hôte ?

POUR EN SAVOIR PLUS

Origine et évolution des cellules

Andersson, S. G. E. *et al.* 1998. The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature* **396**: 133-140. [O]

Castresana, J. and M. Saraste. 1995. Evolution of energetic metabolism: The respiration-early hypothesis. *Trends Biochem. Sci.* 20: 443–448. [R]

Cech, T. R. 1986. A model for the RNA-catalyzed replication of RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 4360–4363. [P]

Crick, F. H. C. 1968. The origin of the genetic code. *J. Mol. Biol.* 38: 367–379. [P]

Darnell, J., Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S. L. & Matsudaria, P. 1997. *Biologie moléculaire de la cellule*. De Boeck-Université, Paris-Bruxelles.

Darnell, J. E. and W. F. Doolittle, 1986. Speculations on the early course of evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 1271–1275. [P]

de Duve, Ch. 1990. *Construire une cellule : essai sur la nature et l'origine de la vie.* De Boeck-Wesmael, Bruxelles.

Duve, Ch. 1996. La naissance des cellules complexes. *Pour la Science* n°224:92-102. [R]

Doolitle; R. F. 1997. Microbial genomes opened up. *Nature* **392**:339-342. [R]

Doolittle, R. F. 1998. L'origine des cellules à noyau. *La Recherche* n°310:44-45.

Fawcett, D. W. 1994. *Bloom and Fawcett: A Textbook of Histology*. 12th ed. New York: Chapman and Hall.

Gesteland, R. F. and J. F. Atkins (eds.). 1993. *The RNA World*. Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Gilbert, S. F. 1996. *Biologie du développement*. traduit de la 4e édition américaine. De Boeck, Bruxelles.

Gilbert, W. 1986. The RNA world. *Nature* 319: 618. [R]

Griffith, A. J. F., Miller, J. H., Suzuki, D. T., Lewontin, R. C. & Gelbart, W. M. 1997. *Introduction à l'analyse génétique*. De Boeck, Bruxelles.

Hennen, G., 1996. *Biochimie humaine : introduction biochimique à la médecine humaine*. De Boeck, Bruxelles.

Horton, H. R., Moran, L. A., Ochs, R. S., Rawn, J. D. et Scrimgeour, K. G. 1994. *Principes de Biochimie*. Traduction de l'ouvrage américain. De Boeck-Wesmael. Bruxelles.

Ingber, D. E., 1998. L'architecture de la vie. *Pour la Science*. Mars 1998:34-45.

Joyce, G. F. 1989. RNA evolution and the origins of life. *Nature* 338: 217–224. [R]

Kasting, J. F. 1993. Earth's early atmosphere. *Science* 259: 920–926. [R]

Knoll, A. H. 1992. The early evolution of eukaryotes: A geological perspective. *Science* 256: 622–627. [R]

Lazcano, A. and S. L. Miller. 1996. The origin and early evolution of life: prebiotic chemistry, the pre-RNA world, and time. *Cell* 85: 793–798. [R]

Lake, J. A. and M. C. Rivera. 1994. Was the nucleus the first endosymbiont ? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 2880–2881. [R]

Le Guyader, H., éd. L'évolution. *Pour la Science (Bibliothèque)* 1998. [R]

Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P. et Darnell, J. 1997. *Biologie moléculaire de la cellule*. Traduction de l'ouvrage américain. De Boeck-Université, Bruxelles.

Margulis, L. 1992. *Symbiosis in Cell Evolution*. 2nd ed. New York: W.H. Freeman.

Margulis, N. & Schwartz, K. V. 1982. *Five kingdoms*. 2nd ed. Freeman & Cy, New York.

Miller, S. L. 1953. A production of amino acids under possible primitive earth conditions. *Science* 117: 528–529. [P]

Nultsch, W. 1998. *Botanique générale*. Traduit de la 10e édition allemande. De Boeck, Bruxelles.

Orgel, L. E. 1992. Molecular replication. *Nature* 358: 203–209. [R]

Pace, N. R. 1992. New horizons for RNA catalysis. *Science* 256: 1402–1403. [R]

Pastel-Vinay, O. & Millet, A. 1997. Comment ça va, Dolly (premier clonage d'un mammifère). *La Recherche* 297:50-63. [R]

Prescott, L. M., Harley, P. J. & Klein, D. A. 1997. *Microbiologie*. traduit de la 2e édition américaine. De Boeck, Bruxelles.

Raven, P. H., R. F. Evert and S. E. Eichhorn. 1992. *Biology of Plants*. 5th ed. New York: Worth.

Rebek, J. Qu'est-ce que la vie ? *Pour la Science* sept. 1994:40-46.

Ridley, M. 1997. *Evolution biologique*. traduction de la 2e édition anglaise. De Boeck-Université, Paris-Bruxelles.

Strickberger, M. W. 1995. *Evolution*. 2nd ed. Boston: Jones and Bartlett.

X, Y, W. 1997. Histoire de la vie : 3 milliards d'années d'évolution. *La Recherche* **296** n° spécial mars. [R]

Woese, C. R., O. Kandler and M. L. Wheelis. 1990. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archae, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 4576–4579. [P]

La cellule en tant que modèle expérimental

Ashburner, M. 1989. Drosophila: *A Laboratory Handbook*. Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Broach, J. R., J. R. Pringle and E. W. Jones (eds.). 1991. *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast* Saccharomyces. Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Condeelis, J. 1993. Understanding the cortex of crawling cells: Insights from *Dictyostelium*. *Trends Cell Biol.* 3: 371–376. [R]

Hodgkin, J., R. H. A. Plasterk and R.H. Waterston. 1995. The nematode *Caenorhabditis elegans* and its genome. *Science* 270: 410–414. [R]

Hogan, B., R. Beddington, F. Costantini and E. Lacey. 1994. *Manipulating the Mouse Embryo*. 2nd ed. Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Maliga, P., D. F. Klessig, A. R. Cashmore, W. Gruissem and J. E. Varner (eds.). 1994. *Methods in Plant Molecular Biology*. Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Meyerowitz, E. M. 1989. *Arabidopsis*, a useful weed. *Cell* 56: 263– 269. [R]

Meyerowitz, E. M. and C. R. Somerville (eds.). 1995. *Arabidopsis*. Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Neidhardt, F. C., R. Curtiss III., J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low Jr., B. Magasanik, W. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter and H. E. Umbarger (eds.). 1996. Escherichia coli *and* Salmonella: *Cellular and Molecular Biology*. 2nd ed. Washington, DC: ASM Press.

Neidhardt, F. C., J. L. Ingraham and M. Schaechter. 1990. *Physiology of the Bacterial Cell*. Sunderland, MA: Sinauer.

Slack, J. M. W. 1991. *From Egg to Embryo: Regional Specification in Early Development*. 2nd ed. New York: Cambridge University Press.

Méthodes de la biologie cellulaire

Bozzola, J. J. and L. D. Russell. 1992. *Electron Microscopy*. Boston: Jones and Bartlett.

Cairns, J., G. S. Stent and J. D. Watson (eds.). 1992. *Phage and the Origins of Molecular Biology*. Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Claude, A. 1975. The coming of age of the cell. *Science* 189: 433–435. [R]

De Duve, C. 1975. Exploring cells with a centrifuge. *Science* 189: 186–194. [R]

Eagle, H. 1955. Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science* 122: 501–504. [P]

Fields, B. N., D. M. Knipe, P. M. Howley, R. M. Chanock, J. L. Melnick, T. P. Monath, B. Roizman and S. E. Straus (eds.). 1996. *Fundamental Virology*. 3rd ed. New York: Lippincott-Raven.

Freshney, R. I. 1993. *Culture of Animal Cells*. 3rd ed. New York: Wiley.

Palade, G. 1975. Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* 189: 347–358. [R]

Porter, K. R., A. Claude and E. F. Fullam. 1945. A study of tissue culture cells by electron microscopy. *J. Exp. Med.* 81: 233–246. [P]

Rawlings, D. J. 1992. *Light Microscopy*. Oxford, England: BIOS Scientific.

Rickwood, D. (ed.). 1993. *Preparative Centrifugation: A Practical Approach*. Oxford, England: IRL Press.

Rous, P. 1911. A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. *J. Exp. Med.* 13: 397–411. [P]

Salmon, E. D. 1995. VE-DIC light microscopy and the discovery of kinesin. *Trends Cell Biol.* 5: 154–158. [R]

Slayter, E. M. and H. S. Slayter. 1992. *Light and Electron Microscopy*. Cambridge, England: Cambridge University Press.

Wang, Y. and D. L. Taylor (eds.). 1989. *Fluorescence Microscopy of Living Cells in Culture*. San Diego, CA: Academic Press.

2

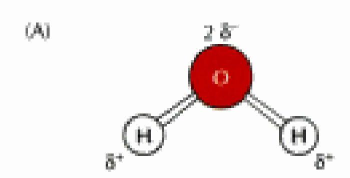
La Cellule en tant que laboratoire de chimie

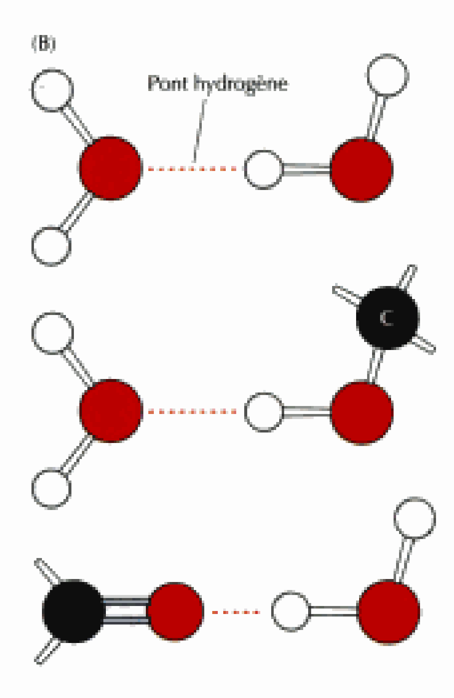
Une cellule est un agencement composite et complexe, capable non seulement de se reproduire, ce qui est l'essence même du vivant, mais aussi de remplir tout une série de tâches singulières chez les unicellulaires et de se spécialiser dans certaines d'entre elles chez les pluricellulaires ; malgré cette diversification, les cellules obéissent toutes aux mêmes lois de la physique et de la chimie qui déterminent le comportement des systèmes inanimés.

Ce chapitre décrit le fondement de la chimie biologique qui régit la vie de la cellule. Loin d'exposer de façon exhaustive les principes biochimiques et la foison des réactions métaboliques intracellulaires, nous nous en tiendrons à cinq points capitaux : les espèces de molécules présentes dans la cellule, le maître rôle des protéines en tant que catalyseurs biochimiques, la production et l'utilisation de l'énergie métabolique, la biosynthèse des principaux constituants cellulaires et la structure des membranes biologiques. Il faut avoir acquis ces bases de chimie biologique avant d'aborder les divers aspects de la structure et du fonctionnement cellulaires, qui feront l'objet des chapitres suivants de ce livre.

CONSTITUANTS MOLÉCULAIRES DE LA CELLULE

Une cellule se compose d'eau, d'ions inorganiques et de molécules dérivées du carbone (en d'autres termes, organiques) ; l'eau y est prédominante, puisqu'elle représente au moins 70 % de la masse totale de la cellule. Aussi, en chimie biologique, ce sont les interactions entre l'eau et les autres constituants cellulaires qui mènent le jeu. La propriété capitale de l'eau à ce point de vue est sa polarité, due à ce que les atomes d'hydrogène portent une faible charge positive et l'atome d'oxygène une faible charge négative (figure 2.1). À cause de cette polarité, les molécules d'eau forment des ponts hydrogène avec leurs voisines ou avec d'autres molécules polaires, et entrent en interaction avec les ions de charge positive ou négative. C'est en raison de ces interactions que les ions et les molécules polaires sont très solubles dans l'eau (ils sont hydrophiles) ; par contre, les molécules non polaires, incapables d'entrer en interaction avec l'eau, sont peu solubles en milieu aqueux (elles sont hydrophobes) ; aussi tendent-elles à réduire leur





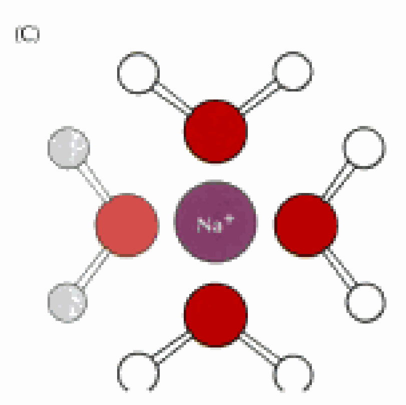


Figure 2.1
Propriétés de l'eau. (A) L'eau est une molécule polaire portant une faible charge négative (δ^-) sur son atome d'oxygène et une faible charge positive (δ^+) sur ses atomes d'hydrogène. À cause de cette polarité, les molécules d'eau forment des liaisons hydrogène (lignes pointillées) soit entre elles, soit avec d'autres molécules polaires (B). Elles peuvent aussi interagir avec des ions (C).

contact avec l'eau, en s'associant étroitement les unes avec les autres. Comme nous allons le montrer, ces interactions des molécules polaires et des molécules apolaires avec l'eau et les unes avec les autres jouent un rôle crucial dans la formation des structures biologiques, notamment des membranes cellulaires.

Les ions inorganiques de la cellule, comme le sodium (Na^+), le potassium (K^+), le magnésium (Mg^{2+}), le calcium (Ca^{2+}), le phosphate (HPO_4^{2-}), le chlorure (Cl^-) et le bicarbonate (HCO_3^-) ne constituent pas plus de 1 % de la masse cellulaire. Ces ions sont en jeu dans maints aspects du métabolisme cellulaire et, de ce fait, ont un rôle clé dans son fonctionnement.

C'est cependant par ses composants organiques que la cellule se singularise ; la plupart appartiennent à l'une des quatre classes de molécules suivantes : les glucides, les lipides, les protéines et les acides nucléiques. Les protéines, les acides nucléiques et la plupart des glucides sont des macromolécules formées par l'union de centaines ou de milliers (polymérisation) de modules de faible poids moléculaire, à savoir acides aminés, nucléotides et sucres simples respectivement. Ces macromolécules comptent pour 80 à 90 % du poids sec de la plupart des cellules. Les lipides sont d'autres constituants importants de la cellule. Le reste de la masse cellulaire comprend une variété de petites molécules organiques, parmi lesquelles des éléments des macromolécules. On voit donc que la chimie cellulaire concerne la structure et le fonctionnement de quatre grandes classes de molécules organiques.

Glucides

Les **glucides** comprennent les sucres simples et les polysaccharides. Les sucres simples sont la nourriture de base des cellules. Nous verrons bientôt que leur dégradation sert à la fois de source énergétique et de matériau de base pour construire d'autres constituants cellulaires. Les polysaccharides sont la forme sous laquelle les cellules mettent les sucres en réserve et construisent leur charpente ; en outre, certains polysaccharides et petits polymères de glucides servent d'étiquette dans une série de processus de reconnaissance cellulaire, notamment dans l'ancrage des cellules à leurs voisines et dans le transport des protéines vers une destination intracellulaire correcte.

La structure de quelques sucres simples (**monosaccharides**) bien connus est indiquée dans la figure 2.2. La formule brute de ces molécules est $(CH_2O)_n$, d'où leur nom ancien d'hydrates de carbone. Le sucre à six carbones ($n = 6$) appelé glucose ($C_6H_{12}O_6$) est primordial pour les cellules, car c'est une de leurs sources principales directes d'énergie. Les autres sucres simples ont de trois à sept carbones, les plus courants comportant trois et cinq atomes de carbone. Les sucres d'au moins cinq atomes de carbone se referment en donnant un cycle, qui est la forme prépondérante de ces molécules dans la cellule. Comme l'indique la figure 2.2, les sucres cyclisés existent sous deux formes (appelées α et β), selon la configuration des atomes liés au carbone 1.

Quand les monosaccharides réagissent entre eux en perdant H_2O, ils se lient par une **liaison glycosidique** tendue entre deux carbones (figure 2.3) ; s'il s'agit seulement de quelques sucres, on a affaire à un **oligosaccharide**, si ce sont des centaines ou des milliers de sucres qui se lient, le polymère formé est une macromolécule appelée **polysaccharide**.

Les polysaccharides bien connus que sont le **glycogène** et l'**amidon** sont les formes de réserve de sucres des cellules respectivement animales et végétales. Glycogène et amidon sont formés exclusivement de molécules de glucose sous la configuration α (figure 2.4), le carbone 1 d'une molécule étant lié au carbone 4 de la molécule suivante. De plus, le glycogène et une espèce d'amidon (l'amylopectine) contiennent de ci de là des liaisons $\alpha(1\rightarrow6)$, c'est-à-dire où le carbone 1 d'un glucose est lié au carbone 6 du glucose voisin. Comme le montre la figure 2.4, ces liaisons permettent la

Trioses ($C_3H_6O_3$)

Glycéraldéhyde

Dihydroxyacétone

Pentoses ($C_5H_{10}O_5$)

Ribose

Forme ouverte

Formes cyclisées

α β

Hexoses ($C_6H_{12}O_6$)

Glucose

Forme ouverte

Formes cyclisées

α β

Figure 2.2
Structure de sucres simples. On montre la structure de types de sucres à trois, cinq et six carbones (triose, pentose et hexose). Les sucres formés d'au moins cinq carbones forment un cycle qui peut exister sous deux formes (α et β) selon la configuration autour du carbone 1.

formation de branchements qui unissent deux chaînes liées par des liaisons α(1→4) ; on trouve pareils branchements dans le glycogène et l'amylopectine, mais une autre forme d'amidon (l'amylose) en est dépourvue.

La structure du glycogène est fondamentalement semblable à celle de l'amidon, comme l'est d'ailleurs leur rôle : constituer une réserve de glucose. La **cellulose**, par contre, a un tout autre rôle, celui de constituant structural majeur de la paroi de la cellule végétale. On est surpris de constater que la cellulose se compose entièrement de molécules de glucose, mais

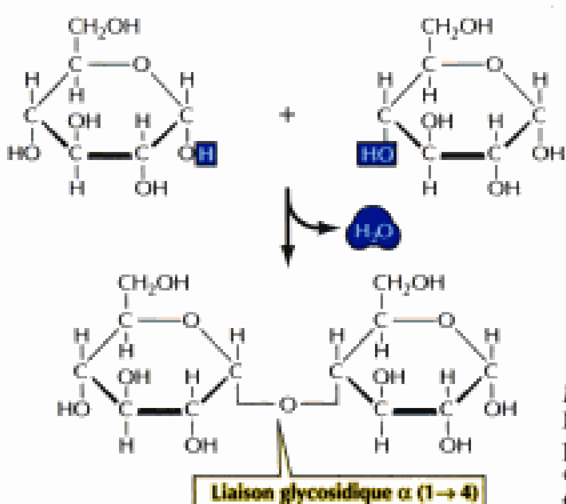
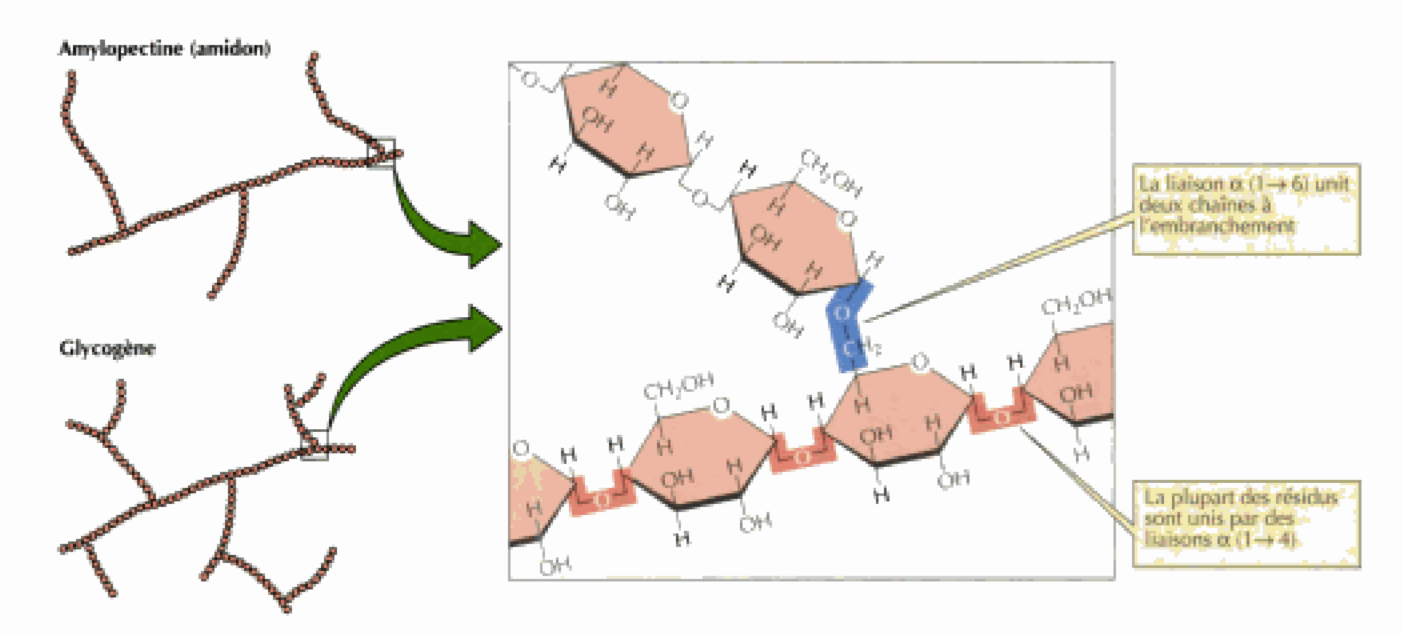


Figure 2.3
Formation d'une liaison glycosidique. Deux sucres simples s'unissent par une réaction de déshydratation ; ici deux molécules de glucose de configuration α se soudent par leurs carbones 1 et 4. La liaison formée est désignée liaison glycosidique α(1→4)



Cellulose

Les résidus sont unis par des liaisons β (1→4)

Figure 2.4
Structure des polysaccharides.
Un polysaccharide est une molécule composée de centaines ou de milliers de sucres simples. Le glycogène, l'amidon et la cellulose se composent tous uniquement de résidus de glucose, unis par des liaisons α(1→4) dans le glycogène et l'amidon, et β(1→4) dans la cellulose. Le glycogène ainsi qu'une des formes d'amidon (l'amylopectine) contiennent de-ci de-là aussi des liaisons α(1→6), qui servent de point de branchement à deux chaînes α(1→4).

dans la cellulose, les résidus glucosyle n'ont pas la configuration α, mais la configuration β ; aussi la cellulose est-elle un polysaccharide non ramifié (voir figure 2.4) dans lequel des liaisons β(1→4) donnent, contrairement aux liaisons α(1→4), une forme très étirée à la chaîne, qui fait que celle-ci s'emboîte dans ses voisines pour constituer des fibres douées d'une grande résistance mécanique.

Outre leur rôle de réserve énergétique et de charpente cellulaire, les oligosacccharides et les polysaccharides interviennent dans toutes sortes de processus de signalisation cellulaire. Ils sont fréquemment greffés à des protéines (**glycoprotéines**), où ils servent d'étiquette lors du guidage des protéines vers la surface cellulaire ou lors de leur incorporation aux divers organites. À la surface des cellules, oligosaccharides et polysaccharides tiennent aussi le rôle de marqueurs, de sorte que les cellules se reconnaissent les unes les autres et interagissent au sein des tissus des organismes pluricellulaires.

Lipides

Les **lipides** ont trois fonctions principales dans la cellule : ils sont d'abord une réserve énergétique importante, ensuite, clé de voûte de la biologie cellulaire, ils sont les composés prépondérants des membranes, enfin, ils interviennent comme signaux cellulaires, tant sous forme d'hormones stéroïdiennes (œstrogènes et testostérone) qu'en tant que messagers transmetteurs de signaux entre des récepteurs extracellulaires et des cibles intracellulaires.

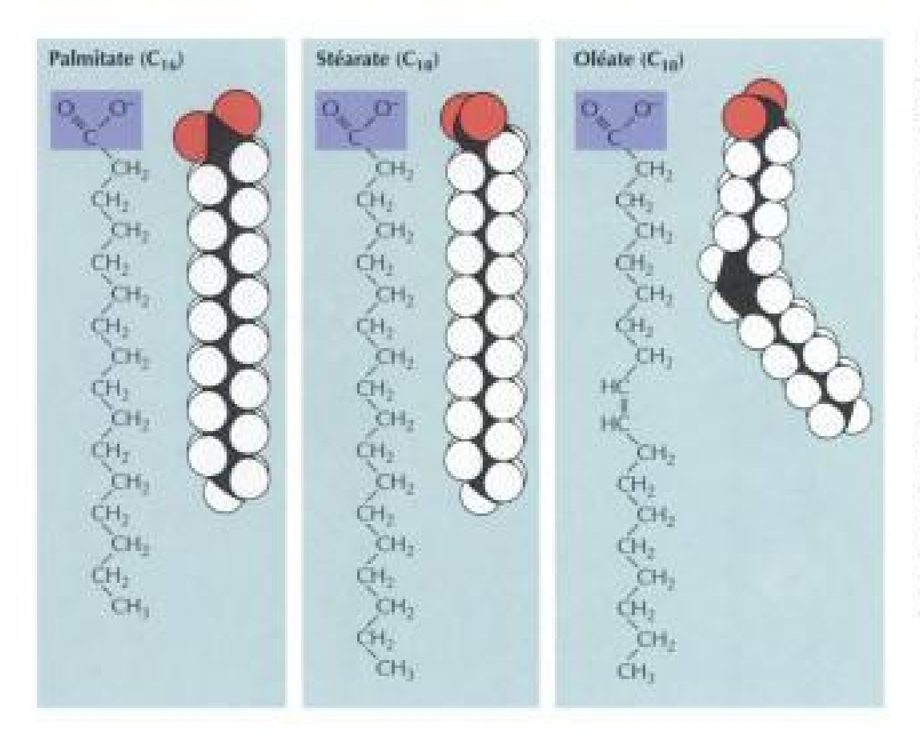
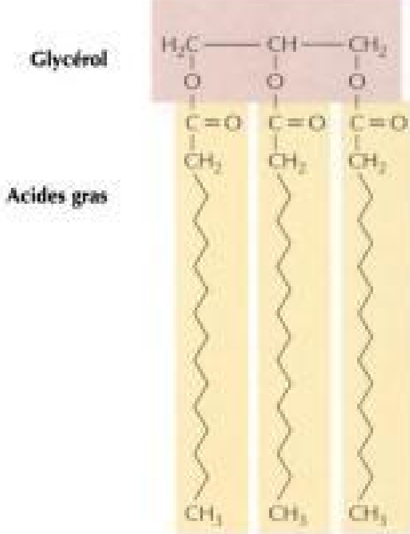
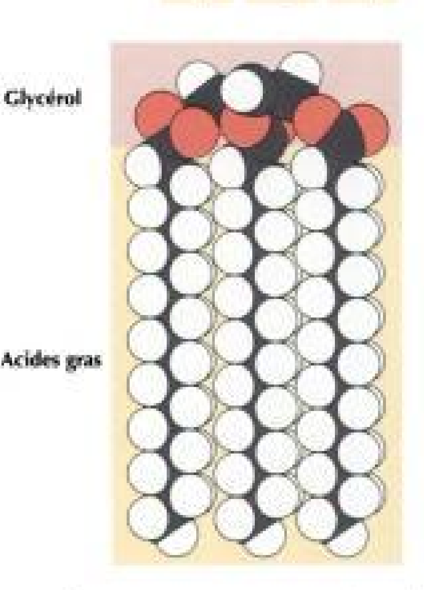


Figure 2.5
Structure des acides gras. Un acide gras est une longue chaîne hydrocarbonée terminée par un groupe carboxyle ($-COO^-$). Le palmitate et le stéarate sont des acides gras saturés de respectivement 16 et 18 atomes de carbone. L'oléate est un acide gras insaturé, à 18 carbones, portant sa liaison double entre les carbones 9 et 10. Notez que la liaison double introduit un coude dans la chaîne aliphatique.

Figure 2.6
Structure d'un triacylglycérol. Les triacylglycérols (graisses) comportent trois acides gras unis au glycérol ; ici, les trois acides gras sont du palmitate, mais les triacylglycérols naturels contiennent souvent un mélange d'acides gras.

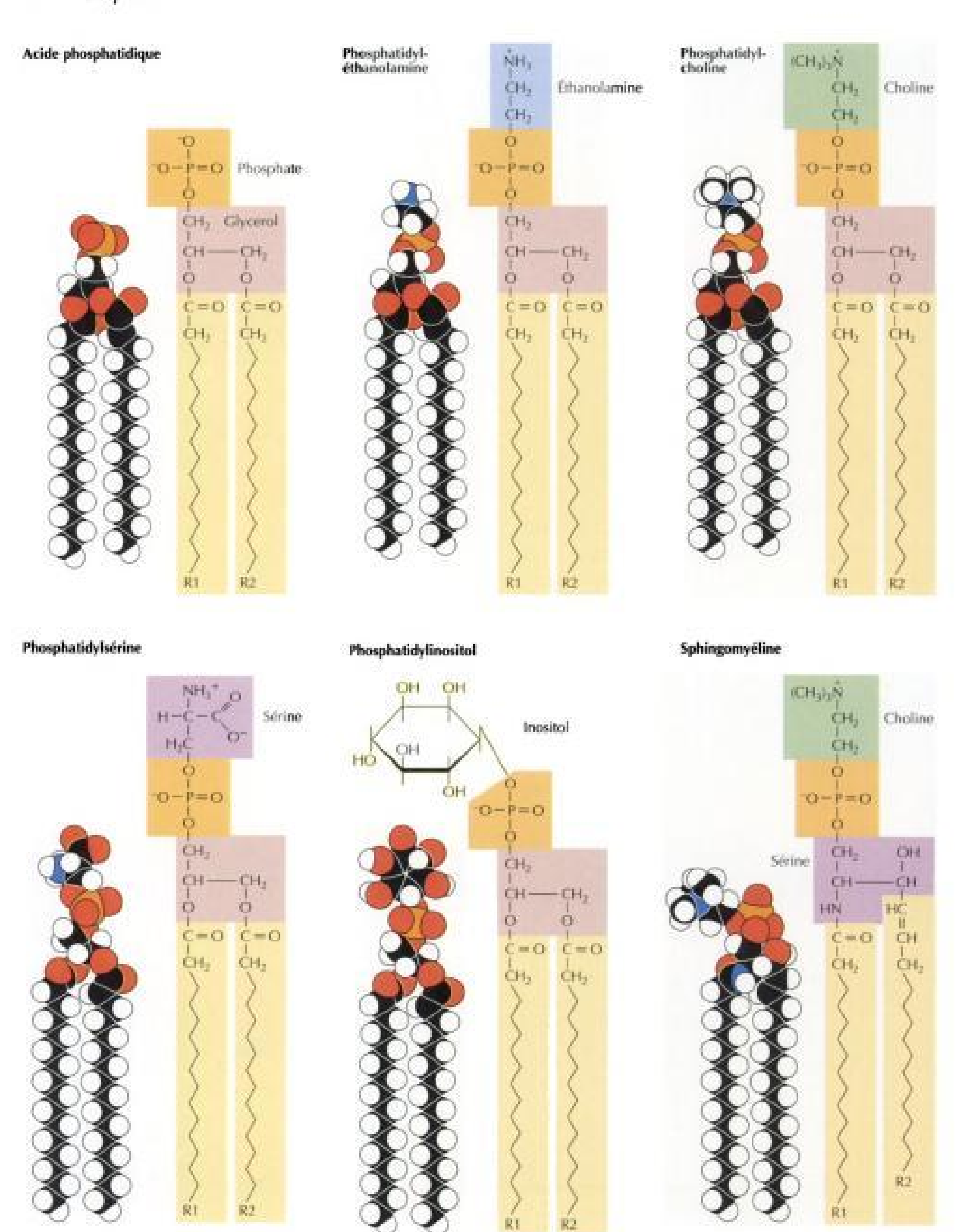




Les lipides les plus simples sont les **acides gras**, des chaînes hydrocarbonées (aliphatiques) longues de 16 à 18 atomes de carbone, dont le dernier est un groupe carboxyle ($-COO^-$)(figure 2.5). Les acides gras insaturés comportent au moins une liaison double entre deux carbones, tandis que les carbones des acides gras saturés sont substitués par le nombre maximal d'atomes d'hydrogène. Ces longues chaînes aliphatiques ne comportent que des liaisons apolaires C–H, incapables de s'associer à l'eau. C'est la nature hydrophobe de ces chaînes d'acides gras qui détermine le caractère des lipides complexes, notamment dans l'assemblage des membranes biologiques.

Les acides gras se trouvent sous forme de **triacylglycérols**, ou **graisses**, composées de trois acides gras liés à une molécule de glycérol (figure 2.6). Étant insolubles dans l'eau, les triacylglycérols s'assemblent en gouttelettes de graisse dans le cytoplasme ; le moment venu, la cellule les utilise dans les réactions qui fournissent de l'énergie libre, comme on va le montrer à la fin de ce chapitre. Notons que les graisses ont un pouvoir énergétique plus élevé que les glucides, puisqu'elles rendent deux fois plus d'énergie que les glucides pour un même poids de matière dégradée. Une réserve d'énergie sous forme de graisses tient donc deux fois moins d'espace corporel qu'une réserve d'énergie équivalente présente sous forme de glucides, avantage majeur pour les animaux, vu leurs déplacements fréquents.

Les **phospholipides**, principaux composants des membranes, comportent deux acides gras greffés, par leur extrémité, à un groupe polaire (figure 2.7). Dans les **glycérophospholipides**, les deux acides gras sont attachés à des atomes de carbone du glycérol, comme dans les triacylglycérols ; le troisième atome de carbone est lié à un groupe phosphate, souvent lui-même substitué par un autre petit groupe polaire, comme la choline, la sérine, l'inositol ou l'éthanolamine. La **sphingomyéline**, le seul phospholipide membranaire dépourvu de glycérol, contient deux chaînes aliphatiques liées à un groupe polaire constitué de sérine au lieu de glycérol. Tous les phospholipides comportent une queue hydrophobe, faite de deux chaînes aliphatiques, et, au pôle opposé, un groupe polaire fait d'un groupe phosphoryle portant des substituants polaires. C'est pourquoi un phospholipi-


Acide phosphatidique
Phosphate
Glycerol
R1
R2
Phosphatidyl-éthanolamine
Éthanolamine
Phosphatidyl-choline
Choline
Phosphatidylsérine
Sérine
Phosphatidylinositol
Inositol
Sphingomyéline
Choline
Sérine

◀ *Figure 2.7*
Structure des phospholipides. Les glycérophospholipides sont formés de deux acides gras liés au glycérol ; les deux acides gras peuvent être différents et on les désigne par R1 et R2. Au troisième carbone du glycérol est greffé un groupe phosphate (en donnant un acide phosphatidique), lui-même lié à une petite molécule polaire (pour donner la phosphatidyléthanolamine, la phosphatidylcholine, la phosphatidylsérine ou le phosphatidylinositol). Dans la sphingomyéline, deux chaînes hydrocarbonées sont greffées à un groupe polaire contenant de la sérine au lieu de glycérol.

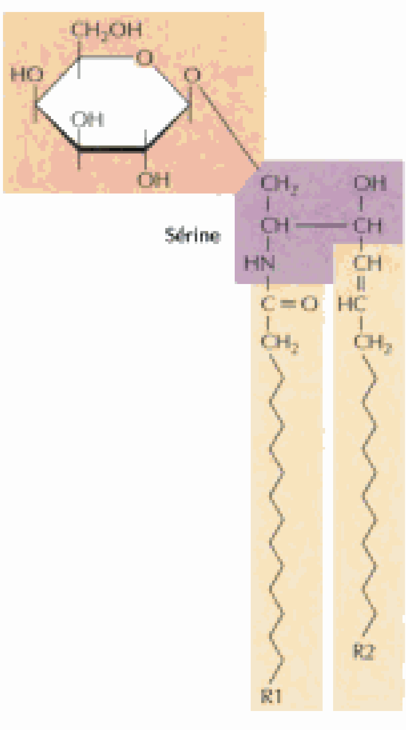


Figure 2.8
Structure des glycolipides. Deux chaînes hydrocarbonées sont greffées à un groupe polaire constitué de sérine et d'un sucre (ici, le glucose).

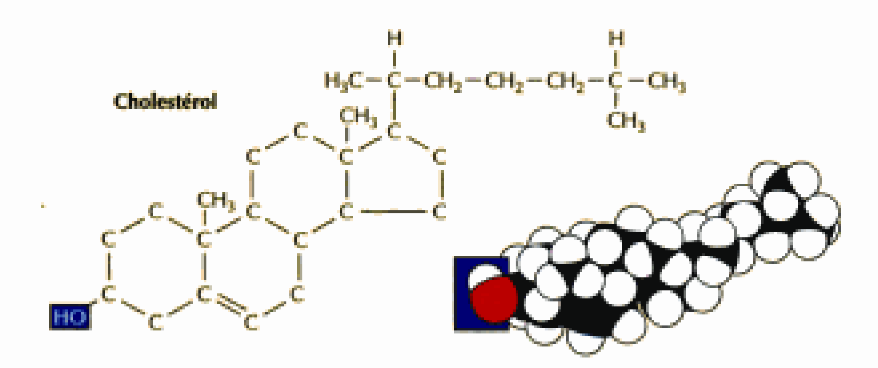
de est une molécule **amphipathique**, c'est-à-dire partie hydrophile, partie hydrophobe. Comme nous le verrons plus loin, cette propriété des phospholipides est la cause de la formation des membranes.

Outre les phospholipides, beaucoup de membranes cellulaires contiennent des **glycolipides** et du **cholestérol**. Un glycolipide se compose de deux chaînes aliphatiques liées à un groupe polaire comportant un glucide (figure 2.8) ; leur nature amphipathique globale rappelle donc celle des phospholipides. Par contre, le cholestérol est formé, non pas de chaînes droites, mais de quatre cycles hydrocarbonés conjugués (figure 2.9), très hydrophobes ; seul le groupe hydroxyle (-OH) greffé à un bout de la molécule est légèrement hydrophile et fait du cholestérol une molécule amphipathique.

En dehors de leur rôle comme composants des membranes cellulaires, les lipides servent de molécules de signalisation, tant au sein d'une cellule qu'entre les cellules. Les **hormones stéroïdiennes** (comme les œstrogènes et la testostérone) sont des dérivés du cholestérol (figure 2.9) ; ces hormones forment une famille de messagers chimiques comportant tous quatre cycles hydrocarbonés, mais distincts par au moins un substituant particulier greffé aux cycles. Certains dérivés de phospholipides sont aussi des messagers chimiques, intracellulaires, médiateurs de signaux entre la membrane plasmique et l'intérieur de la cellule (voir chapitre 13).

Acides nucléiques

Les acides nucléiques — ADN et ARN — sont les principales molécules détentrices de l'information de la cellule. L'**acide désoxyribonucléique**



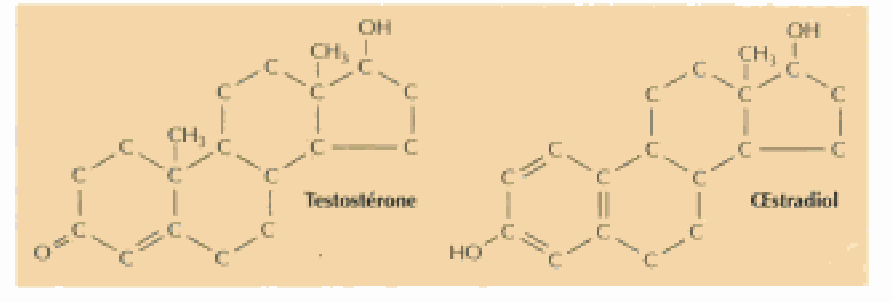


Figure 2.9
Cholestérol et hormones stéroïdes. Le cholestérol, important élément des membranes cellulaires, est une molécule amphipathique, à cause de son groupe polaire hydroxyle. C'est aussi un précurseur d'hormones stéroïdes, comme la testostérone et l'œstradiol (de la famille des œstrogènes). On a omis ici de dessiner les atomes d'hydrogène fixés au cycle.

(ADN) joue le rôle unique de matériau génétique, contenu, chez les eucaryotes, dans le noyau. Les divers types d'**acides ribonucléiques (ARN)** remplissent plusieurs rôles dans la cellule. L'**ARN messager (ARNm)** passe l'information de l'ADN aux ribosomes, en servant de matrice pour la synthèse des protéines. Les autres ARN (**ARN ribosomial** et **ARN de transfert**) interviennent dans la synthèse des protéines, d'autres encore dans la maturation et le transport des ARN et des protéines. Outre son rôle de molécule porteuse d'information, l'ARN est capable de catalyser certaines réactions chimiques, à savoir, chez les cellules contemporaines, des réactions impliquées dans la synthèse protéique et dans la maturation des ARN.

L'ADN et l'ARN sont des polymères de **nucléotides**, formés de **purines** et de **pyrimidines**, des bases liées à des sucres phosphorylés (figure 2.10). L'ADN contient deux purines (**adénine et guanine**) et deux pyrimidines (**cytosine** et **thymine**). On retrouve les adénine, guanine et cytosine dans l'ARN, mais celui-ci contient de l'**uracile** au lieu de thymine. Ces bases sont liées à un sucre (le **2'-désoxyribose** dans l'ADN, le **ribose** dans l'ARN)

Figure 2.10
Composants des acides nucléiques. Un acide nucléique contient des bases puriniques et pyrimidiniques, liées à un sucre phosphorylé. Une base d'acide nucléique liée à un sucre non substitué forme un nucléoside ; un nucléotide contient en sus au moins un groupe phosphate.

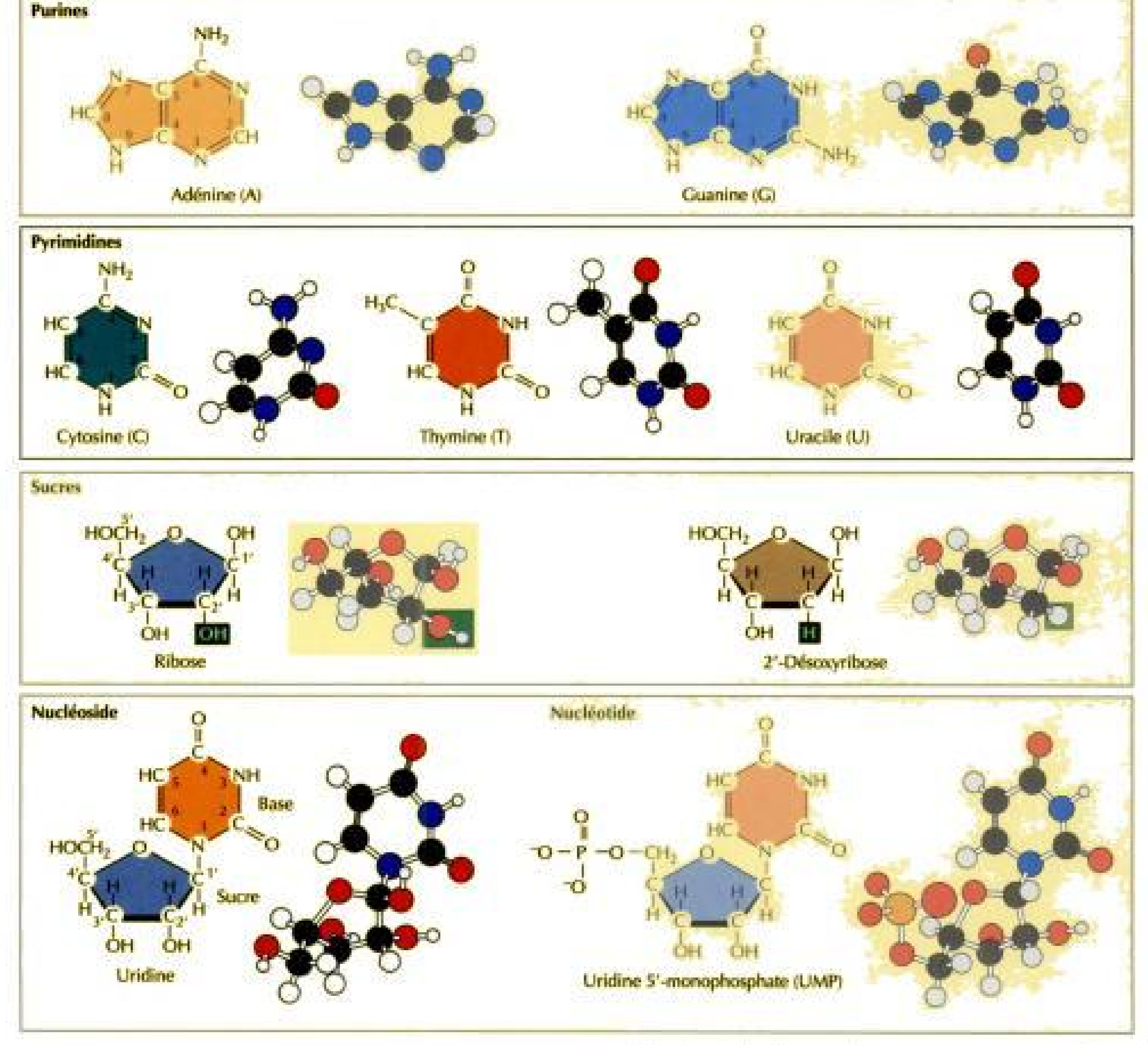


Figure 2.11
Polymérisation de nucléotides. Il se forme une liaison phosphodiester entre le groupe hydroxyle 3′ d'un nucléotide et le groupe phosphate 5′ d'un autre nucléotide. Une chaîne polynucléotidique a un sens, car à un bout elle se termine par un groupe phosphate 5′ (le bout 5′) et à l'autre par un groupe hydroxyle 3′ (le bout 3′).

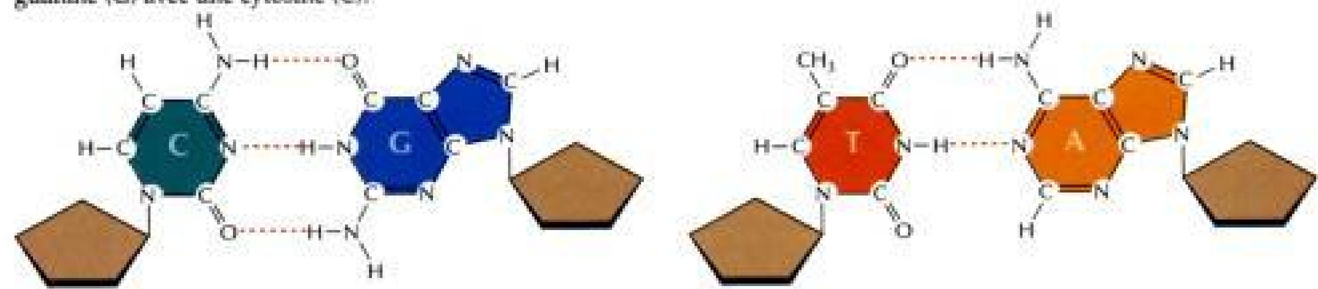
pour former un **nucléoside** ; un nucléotide contient en plus au moins un groupe phosphoryle greffé au carbone 5′ du sucre nucléosidique.

La polymérisation des nucléotides en acides nucléiques met en jeu la formation de liaisons **phosphodiester** entre le groupe 5′-phosphate d'un nucléotide et le groupe hydroxyle 3′ d'un autre nucléotide (figure 2.11). Un oligonucléotide est un petit polymère composé de quelques nucléotides seulement ; les grands polynucléotides comme l'ARN et l'ADN comportent respectivement des milliers et des millions de nucléotides. Insistons sur le fait qu'une chaîne polynucléotidique a un sens puisqu'un bout se termine par un groupe phosphate 5′ et l'autre par un groupe hydroxyle 3′. Un polynucléotide est toujours synthétisé dans le sens 5′→3′, le nucléotide entrant étant toujours greffé au groupe hydroxyle 3′ d'une chaîne naissante. On est convenu d'écrire aussi (de gauche à droite) la séquence des bases de l'ADN et de l'ARN dans le sens 5′→3′.

L'information codée dans l'ADN et dans l'ARN dépend de l'ordre dans lequel les bases se suivent dans la chaîne polynucléotidique. L'ADN est une molécule bicaténaire formée de deux chaînes polynucléotidiques courant en sens opposé (voir chapitre 3) ; les bases sont tournées vers l'intérieur de la molécule et les deux chaînes sont associées *via* des liaisons hydrogène reliant les bases d'une paire complémentaire, à savoir l'adénine avec la thymine et la guanine avec la cytosine (figure 2.12). Un corollaire important de cet appariement de bases complémentaires est qu'un brin d'ADN (ou d'ARN) peut servir de matrice pour la synthèse du brin complémentaire ; c'est donc le propre des acides nucléiques de régir leur autoréplication et de fonctionner comme molécules essentiellement chargées de l'information génétique ; celles-ci pilotent la synthèse de toutes les protéines, auxquelles la cellule doit toutes ses fonctions biologiques.

Outre leur rôle de modules pour construire les acides nucléiques, les nucléotides jouent encore d'autres rôles ; un des plus importants est celui de l'adénosine 5′-triphosphate (ATP), principal donneur d'énergie chimique dans la cellule. De même, d'autres nucléotides servent soit de donneurs d'énergie, soit de donneurs de groupes chimiques dans toute une série de réactions métaboliques. En outre, certains nucléotides (par exemple, l'AMP cyclique), sont d'importantes molécules intracellulaires de signalisation (voir chapitre 13).

Figure 2.12
Appariement complémentaire entre bases d'acides nucléiques. La formation de liaisons hydrogène entre bases de brins opposés d'un ADN provoque l'appariement spécifique d'une adénine (A) avec une thymine (T) et d'une guanine (G) avec une cytosine (C).



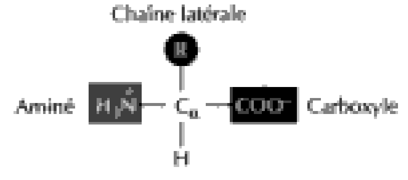


Figure 2.13
Structure d'un acide aminé. Un acide aminé comporte un atome central de carbone (la carbone α), lié à un atome d'hydrogène, à un groupe carboxyle, à un groupe aminé et à une chaîne latérale particulière (désignée R). Tant le groupe carboxyle que le groupe aminé sont ionisés à pH physiologique.

Protéines

Alors que les acides nucléiques portent l'information génétique de la cellule, le rôle premier des **protéines** est d'exécuter les tâches prescrites par cette information. Les protéines sont les macromolécules le plus diversifiées : chaque cellule en contient des milliers d'espèces différentes, chacune chargée d'une besogne particulière. Les protéines servent à bâtir les structures des cellules et des tissus, à transporter et à accumuler de petites molécules (O_2 pour l'hémoglobine), à transmettre des informations de cellule à cellule (les hormones protéiques) et à défendre l'organismes contre les intrus (les anticorps). La propriété transcendante des protéines est cependant leur capacité à agir comme enzymes, qui, comme nous le montrerons, catalysent presque toutes les réactions chimiques des systèmes biologiques ; aussi les protéines pilotent-elles toutes les activités cellulaires, d'où leur étymologie, venue du grec *proteios*, c'est-à-dire de premier ordre.

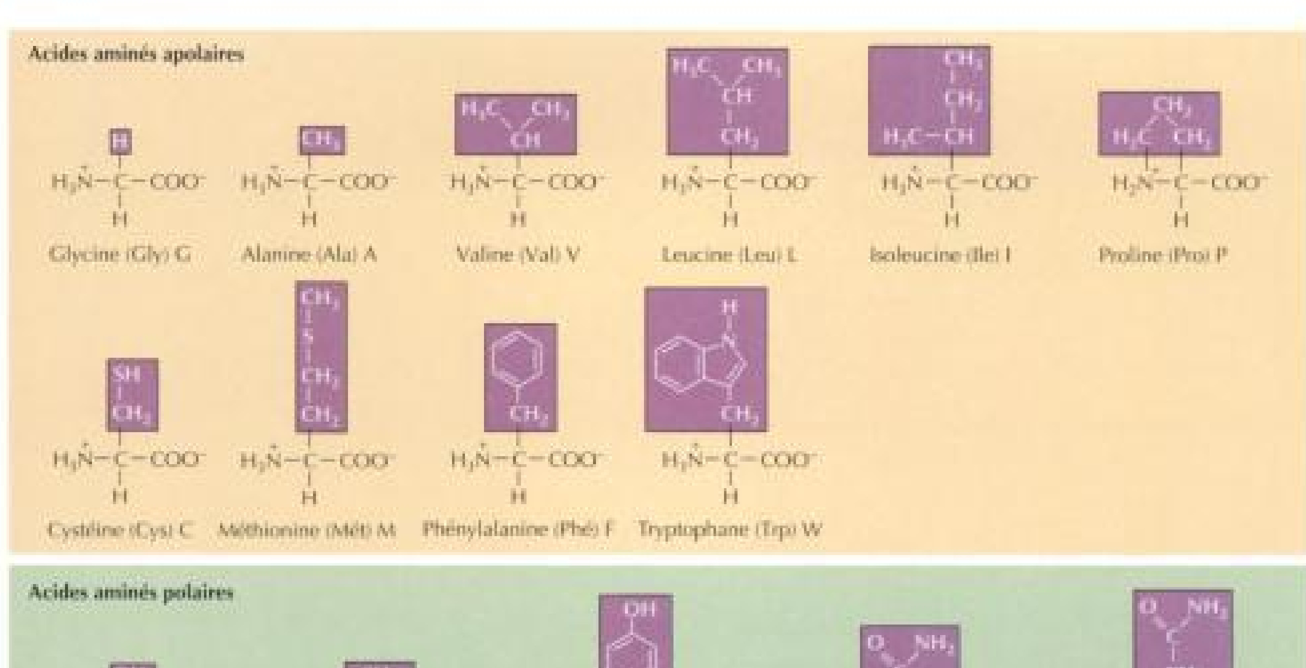
Les protéines sont des polymères formés à partir de 20 **acides aminés** différents. Chacun d'eux comprend un atome de carbone (le carbone α) portant un groupe carboxyle ($-COO^-$), un groupe aminé ($-NH_3^+$), un atome d'hydrogène et une chaîne latérale propre à chaque espèce d'acide aminé (figure 2.13) ; c'est le caractère chimique particulier de cette chaîne latérale qui dicte le rôle singulier que joue chaque acide aminé dans la structure et la fonction de la protéine.

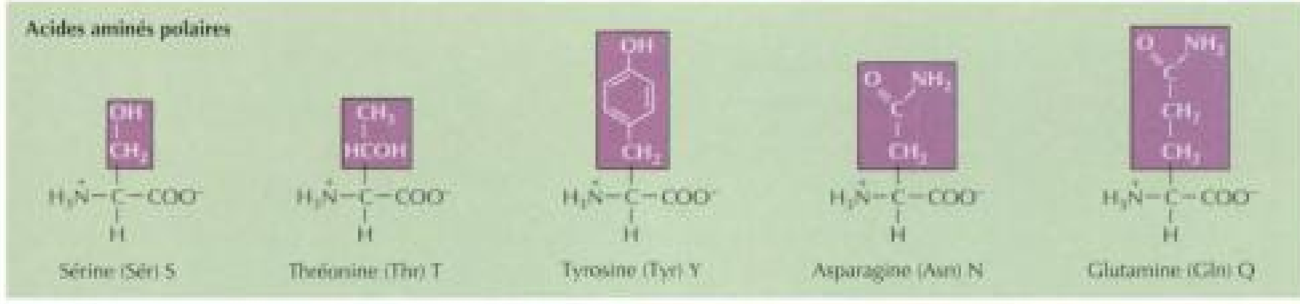
Selon les propriétés de leur chaîne latérale, on groupe les acides aminés en quatre larges catégories (figure 2.14). Dix portent une chaîne latérale apolaire, qui n'interagit pas avec l'eau. La glycine est l'acide aminé le plus simple, puisque sa chaîne latérale ne consiste qu'en un atome d'hydrogène. La chaîne latérale des alanine, valine, leucine et isoleucine ne compte qu'au plus quatre atomes de carbone ; ces chaînes sont hydrophobes et tendent à s'insérer au cœur des protéines, où elles sont à l'abri de l'eau. La proline porte aussi une chaîne semblable, mais elle est unique en ce que cette chaîne est non seulement liée au carbone α, mais aussi à l'azote du groupe aminé, en formant un cycle. La chaîne latérale de deux acides aminés, la cystéine et la méthionine, contient un atome de soufre ; la méthionine est très hydrophobe, mais la cystéine l'est à peine à cause de son groupe sulfhydryle (-SH). Comme nous le verrons, le groupe sulfhydryle de la cystéine joue un rôle crucial dans la structure protéique, car il peut former des ponts disulfure entre les chaînes latérales de résidus cystéinyle différents. Enfin, deux acides aminés non polaires, la phénylalanine et le tryptophane, portent une chaîne latérale comportant un noyau aromatique très hydrophobe.

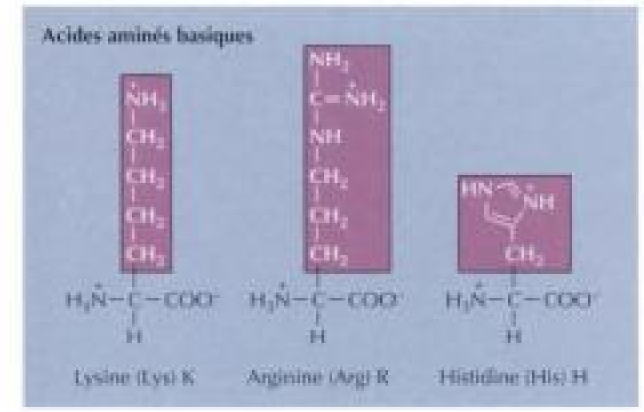
Cinq acides aminés possèdent une chaîne latérale non chargée, mais polaire : la sérine, la thréonine et la tyrosine possèdent un groupe hydroxyle dans leur chaîne, tandis que l'asparagine et la glutamine possèdent un groupe amide polaire ($O{=}C{-}NH_2$) ; comme la chaîne latérale polaire de ces acides aminés forme des liaisons hydrogène avec l'eau, ces acides aminés sont hydrophiles et tendent à gagner la surface de la protéine.

La chaîne latérale des lysine, arginine et histidine porte un groupe basique chargé ; la lysine et l'arginine sont très basiques et leur chaîne latérale est chargée positivement dans la cellule ; ils sont donc très hydrophiles et ils se trouvent en contact avec l'eau à la surface des protéines. Étant soit non chargée soit chargée positivement à pH physiologique, l'histidine joue un rôle actif dans les réactions enzymatiques impliquant un échange de protons, comme on le montrera par l'exemple de catalyse enzymatique dans la section qui suit.

Les deux derniers acides aminés, les acides aspartique et glutamique, portent des chaînes latérales qui se terminent par un groupe carboxyle, chargé négativement dans la cellule et, pour cette raison, appelés plus logiquement aspartate et glutamate. Comme les acides aminés basiques, ils







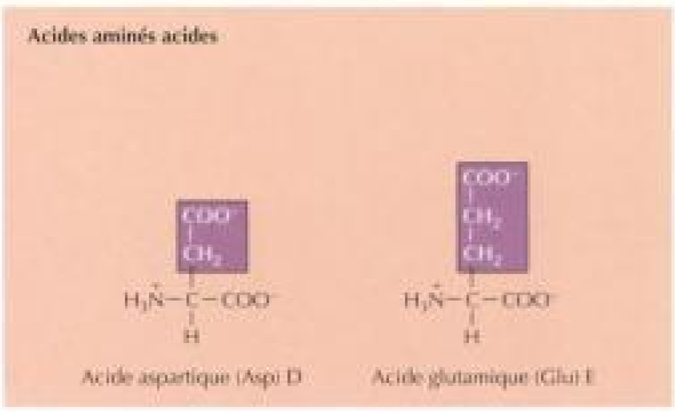


Figure 2.14
Liste des principaux acides aminés. On a indiqué le code à une lettre et le code à trois lettres des acides aminés. Ceux-ci sont groupés en quatre catégories, selon les propriétés de leur chaîne latérale : apolaire, polaire, basique et acide.

sont très hydrophiles et se trouvent habituellement à la surface des protéines.

Les acides aminés s'unissent *via* une **liaison peptidique** entre le groupe aminé α d'un acide aminé et le groupe carboxyle α d'un autre acide aminé (figure 2.15). Un **polypeptide** est une chaîne linéaire comprenant en général quelques centaines ou quelques milliers de résidus d'acides aminés ; ses extrémités sont différentes : l'une se termine par un groupe aminé α (le bout aminé, N-terminal), l'autre par un groupe carboxyle α (le bout carboxylique, ou C-terminal). Un polypeptide est synthétisé en allant du groupe aminé vers le groupe carboxyle et la séquence de ses acides aminés s'écrit de gauche à droite, par convention, dans le même ordre.

Le trait caractéristique d'une protéine est qu'elle est un polypeptide où la suite des résidus d'acide aminé est singulière. En 1953, Frederick Sanger réussit pour la première fois à décrypter la séquence complète d'une pro-

EXPÉRIENCE CLÉ



Reploiement des chaînes polypeptidiques

Reductive Cleavage of Disulfide Bridges in Ribonuclease
Michael Sela, Frederick H. White, Jr., and Christian B. Anfinsen
National Institutes of Health, Bethesda, MD
Science, Volume 125, 1957, pages 691–692.

Contexte

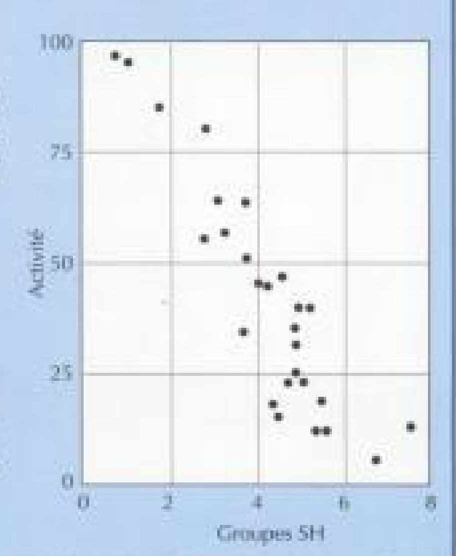
Dans leur structure, les protéines natives sont bien plus complexes que les chaînes linéaires d'acides aminés. Les enzymes seraient inertes et les autres protéines non fonctionnelles si leur chaîne polypeptidique n'était reployée en structure tridimensionnelle de conformation singulière. Cette distinction entre chaîne polypeptidique et protéine soulève des questions primordiales quant à notre compréhension du rapport entre structure et fonction : comment une protéine adopte-t-elle la conformation correcte parmi les nombreuses conformations potentielles d'un polypeptide ? De quelle nature est l'information qui pilote le reploiement de cette chaîne ?

Les expériences classiques de Christian Anfinsen et de ses collègues permirent de répondre à ces questions. En étudiant la ribonucléase, ils montrèrent que certaines protéines dénaturées sont capables de recouvrer leur conformation native ; ce n'est donc rien d'autre que la séquence primaire d'acides aminés qui contient l'information requise pour dicter la conformation tridimensionnelle correcte de la protéine. Plusieurs expériences de ce genre persuadèrent Anfinsen que la structure native en trois dimensions de la protéine correspond à sa conformation thermodynamiquement le plus stable, dictée par les interactions entre les chaînes latérales des acides aminés constitutifs. Les résultats originaux soutenant ce principe crucial furent publiés en 1957 par Anfinsen, Sela et White.

Preuve expérimentale

La protéine étudiée par Sela, White et Anfinsen était la ribonucléase bovine, une petite protéine de 124 résidus qui comporte quatre liaisons disulfure (S-S) entre des résidus cystéine. Ils en mesuraient facilement l'activité enzymatique, témoin de l'état natif de la protéine, en suivant la vitesse à laquelle un ARN est dégradé en nucléotides. Cette activité disparaissait quand on traitait la ribonucléase de façon à rompre ses liaisons non covalentes (par exemple, les liaisons hydrogène) et à couper ses liaisons disulfure en les réduisant en groupes sulfhydryle (-SH). La protéine dénaturée devait donc se trouver inerte, sous forme de conformation au hasard.

Ces expérimentateurs observèrent un fait important, à savoir que l'activité enzymatique réapparaissait si on incubait la protéine dénaturée dans des conditions permettant à la chaîne polypeptidique de se reployer et aux liaisons disulfure de se reformer. Ils procédaient comme suit : ils éliminaient l'agent dénaturant et incubaient l'enzyme à température ordinaire dans un tampon physiologique en présence d'oxygène. Ceci réoxydait les groupes sulfhydryle en ponts disulfure ; pendant ce temps, l'enzyme devait se reployer dans sa conformation native, puisqu'il retrouvait son activité catalytique. Comme aucun autre composant cellulaire n'était présent dans le milieu d'incubation, la séquence primaire d'acides aminés de



Résumé des résultats d'expériences de renaturation. On a porté (en ordonnée) l'activité enzymatique de la ribonucléase en fonction du nombre de groupes sulfhydryle (-SH) présents après divers traitements (en abscisse) ; l'activité enzymatique est exprimée en pourcentage de l'activité de l'enzyme natif.

téine, l'insuline ; il montra que l'insuline se compose de deux chaînes polypeptidiques unies par des liaisons disulfure formées entre des résidus cystéine (figure 2.16). Le nœud de la découverte de Sanger était que chaque protéine possède une séquence propre de résidus d'acide aminé. À présent, on séquence les protéines grâce un instrument automatisé, et on connaît la séquence de milliers de protéines ; chacune est une suite unique d'acides aminés, dictée par l'ordre dans lequel se suivent les nucléotides du gène correspondant (voir chapitre 3).

Reploiement des chaînes polypeptiques (suite)

la chaîne polypeptidique devait contenir toute l'information nécessaire au reploiement correct de la chaîne.

Portée de la découverte

La suite des expériences permit de définir les conditions dans lesquelles la ribonucléase retrouvait entièrement sa structure native et son activité enzymatique, consolidant ainsi l'hypothèse « thermodynamique » du reploiement des chaînes protéiques : la structure tridimensionnelle native d'une protéine est l'état thermodynamiquement le plus stable dans les conditions physiologiques. Cette stabilité thermodynamique dépend d'interactions entre les acides aminés constitutifs, de sorte que la structure tridimensionnelle des protéines est directement dictée par la séquence de leurs acides aminés ; comme celle-ci est déterminée par l'ordre des nucléotides de l'ADN, il s'ensuit que la séquence nucléotidique d'un gène comprend toutes les informations requise pour mettre en place la structure tridimensionnelle de la protéine qu'il code.

Si les travaux d'Anfinsen établirent la base thermodynamique du reploiement des chaînes protéiques, on est encore loin de comprendre les détails du mécanisme en jeu. Le reploiement d'une chaîne polypeptidique est en effet tellement complexe qu'on est loin de pouvoir déduire la structure spatiale d'une protéine directement à partir de sa séquence primaire. Notons aussi que le reploiement spontané d'une chaîne polypeptidique *in vitro* est beaucoup plus lent que dans la cellule, là où il est secondé par des enzymes (voir chapitre 7). Le reploiement des protéines reste donc un problème primordial pour les biochimistes.


Christian Anfinsen

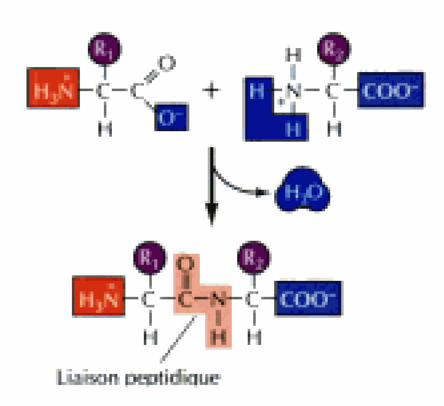
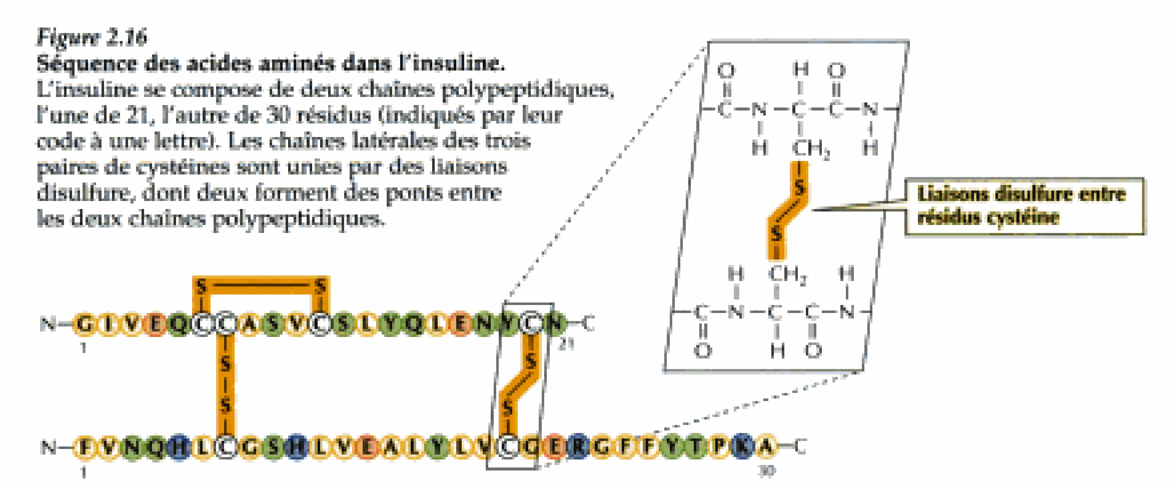


Figure 2.15
Formation de la liaison peptidique. Le groupe carbonyle d'un acide aminé se lie au groupe aminé d'un autre acide aminé.

La séquence d'acides aminés d'une protéine n'est que le premier aspect de sa structure ; loin d'être une chaîne étirée de résidus d'acide aminé, la chaîne polypeptidique adopte une conformation spatiale qui lui est propre et dont dépend strictement sa fonction. Ces conformations tridimensionnelles résultent d'interactions entre les acides aminés constitutifs, de sorte que la forme d'une protéine est dictée par la séquence de ses acides aminés. Ceci fut montré pour la première fois par les expériences de Christian Anfinsen ; il détruisait la structure tridimensionnelle des protéines en les traitant, par exemple, par un chauffage, qui démolit les liaisons non covalentes, ce qu'on appelle une dénaturation (figure 2.17). En les incubant ensuite dans des conditions douces, ces protéines récupéraient souvent spon-

Figure 2.16
Séquence des acides aminés dans l'insuline. L'insuline se compose de deux chaînes polypeptidiques, l'une de 21, l'autre de 30 résidus (indiqués par leur code à une lettre). Les chaînes latérales des trois paires de cystéines sont unies par des liaisons disulfure, dont deux forment des ponts entre les deux chaînes polypeptidiques.



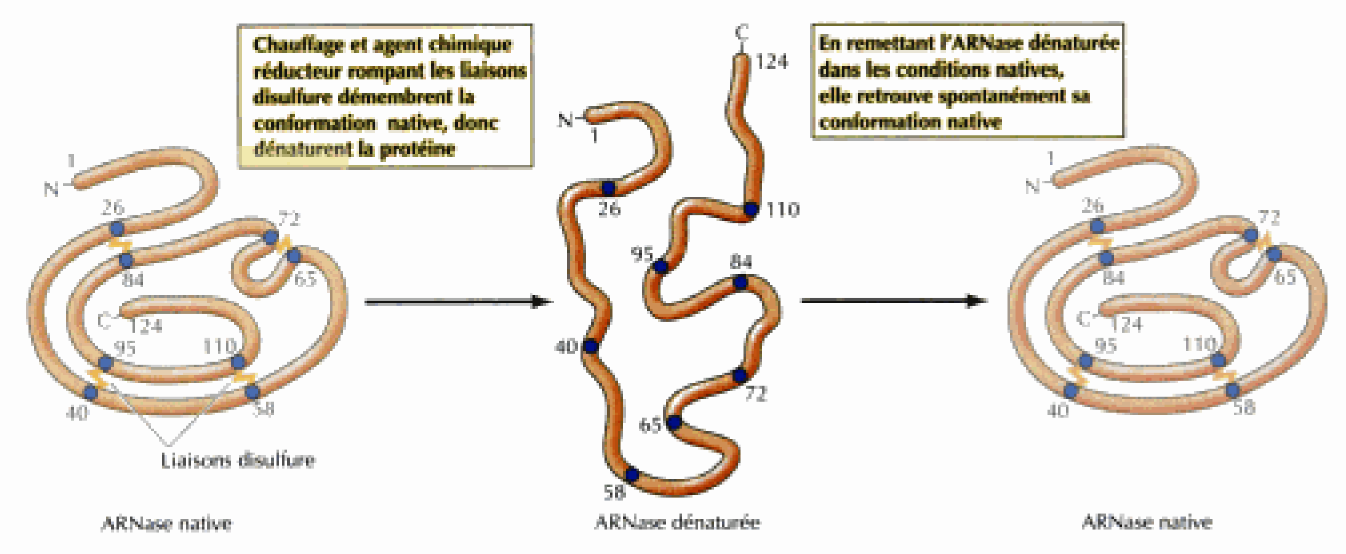


Figure 2.17
Dénaturation et reploiement d'une protéine. La ribonucléase (ARNase) est une protéine de 124 résidus (numérotés le long du squelette). La protéine est normalement reployée dans sa conformation native, comportant quatre liaisons disulfure (les paires de cercles représentant les résidus cystéine).

tanément leur conformation native, ce qui prouve que ces conformations dérivent directement de la séquence d'acides aminés.

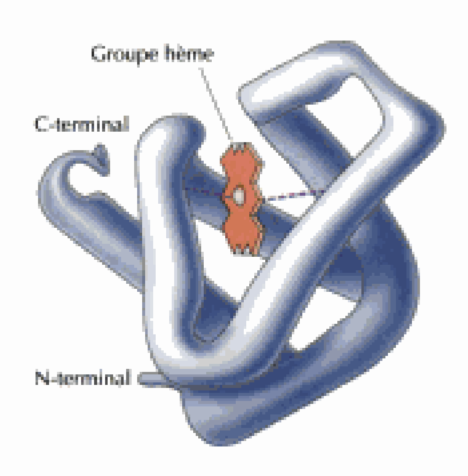
On étudie habituellement la structure spatiale des protéines par la **cristallographie sous rayons X**, une méthode à haut pouvoir de résolution qui montre l'arrangement de chaque atome dans la molécule. On dirige un faisceau de rayons X sur un cristal de la protéine étudiée et on enregistre sur un film sensible l'image des rayons diffractés par le cristal de protéine : le profil de diffraction est caractéristique de l'arrangement des atomes au sein de la molécule. On sait donc déduire la structure de la molécule à partir du diffractogramme X (le spectre de diffraction).

John Kendrew fut le premier, en 1958, à déterminer la structure tridimensionnelle d'une protéine, la myoglobine, une protéine relativement petite, de 153 résidus d'acide aminé (figure 2.18) ; depuis cette époque, on est arrivé à déchiffrer plus de 3 000 structures protéiques. Comme la myoglobine, la plupart des protéines sont globulaires, avec des chaînes polypeptidiques reployées en structure compacte, bien que certaines, qui composent les fibres du tissu conjonctif, soient de longues molécules fibrillaires. L'examen de la structure tridimensionnelle de ces protéines globulaires a révélé les principes de bases qui gouvernent le reploiement des chaînes, mais la structure des protéines est si complexe qu'on n'arrive pas encore à prévoir la structure spatiale d'une protéine en partant de sa séquence d'acides aminés.

On décrit d'habitude la structure d'une protéine selon quatre niveaux hiérarchiques. La **structure primaire** d'une protéine est la séquence des résidus d'acide aminé de sa chaîne polypeptidique. La **structure secondaire** est l'arrangement régulier de ces résidus dans des zones définies de la chaîne polypeptidique ; en 1951, Linus Pauling et Robert Corey en ont décrit les deux types le plus courants, l'**hélice** α et le **feuillet** β. Ces deux types de structure secondaire sont maintenus par des liaisons hydrogène tendues entre les groupes =NH et =CO des liaisons peptidiques. Une hélice α se forme là où une région de la chaîne s'enroule en vrille, le groupe =CO des liaisons peptidiques partageant une liaison hydrogène avec le groupe =NH des liaisons peptidiques situées quatre résidus en aval sur la chaîne polypeptidique (figure 2.19). Un feuillet β, au contraire, se forme quand deux zones d'un polypeptide s'accolent côte à côte en partageant des liaisons hydrogène ; ces feuillets β peuvent se former entre plusieurs tronçons du polypeptide, et courir en sens parallèle ou en sens contraire.

La **structure tertiaire** concerne un reploiement de la chaîne polypeptidique tel qu'il résulte d'interactions entre chaînes d'acides aminés apparte-

Figure 2.18
Structure tridimensionnelle de la myoglobine. La myoglobine comporte 153 résidus d'acide aminé ; elle participe au transport d'oxygène. Sa chaîne polypeptidique est reployée autour du groupe hème qui sert à fixer l'oxygène.



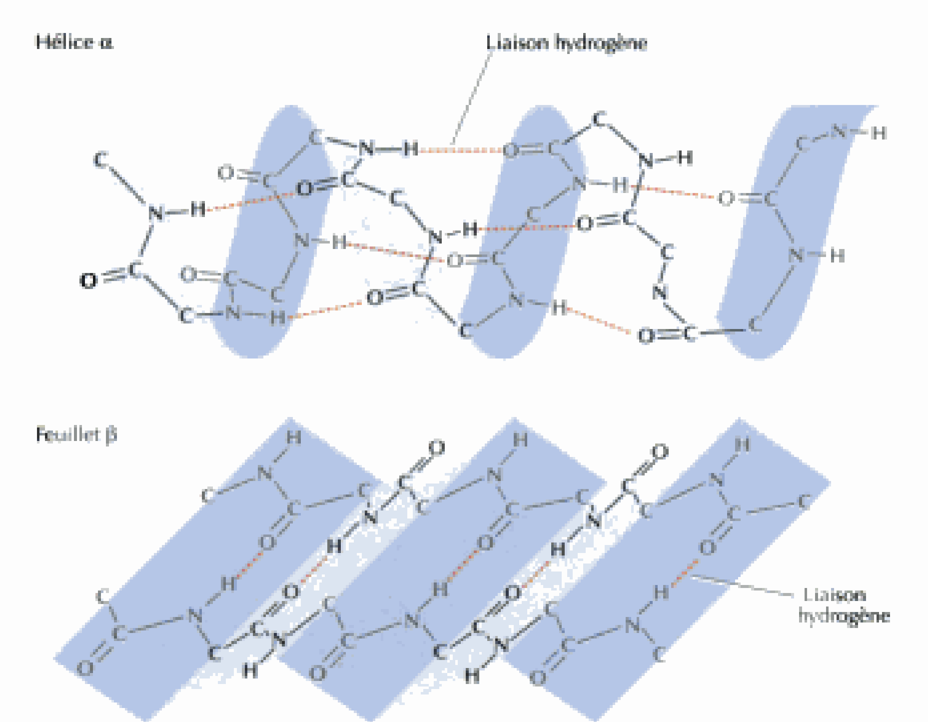


Figure 2.19
Structure secondaire d'une protéine. Les types les plus courants de structure secondaire sont l'hélice α et le feuillet β. Dans une hélice α, il se forme des liaisons hydrogène entre les groupes =CO et =NH de liaisons peptidiques séparées par quatre résidus. Dans un feuillet β, les liaisons hydrogène unissent deux zones d'une chaîne polypeptidique accolées côté à côte. On n'a pas dessiné les chaînes latérales.

nant à des régions non connexes de la séquence primaire (figure 2.20). Dans la plupart des protéines, un ensemble d'hélices α et de feuillets β, unis par des régions de la chaîne repliées en boucles, se tassent en globules compacts appelés **domaines**, les éléments de base de la structure tertiaire. De petites protéines, comme la ribonucléase ou la myoglobine, ne comportent qu'un seul domaine, les grandes protéines comptent plusieurs domaines, chacun chargé en général d'une fonction particulière.

Un trait déterminant de la structure tertiaire est le fait que les résidus d'acide aminé hydrophobes occupent le cœur de la protéine et les hydro-

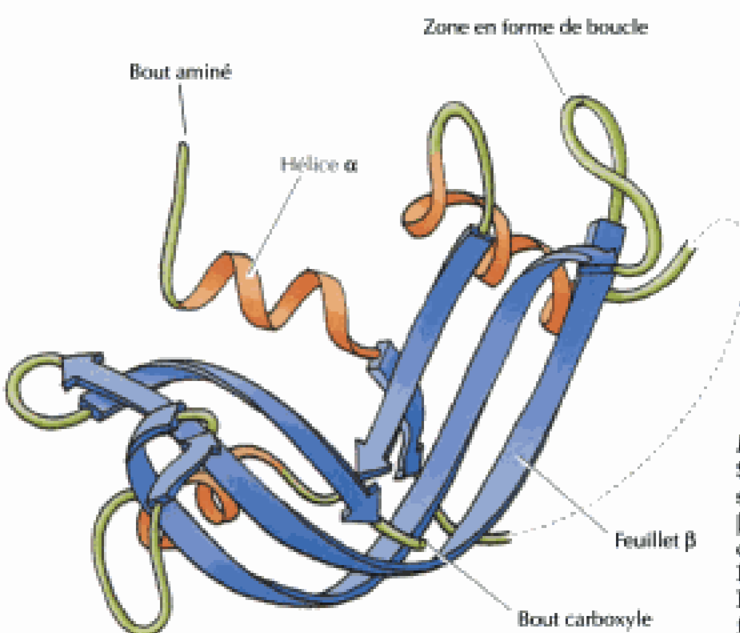


Figure 2.20
Structure tertiaire de la ribonucléase. Les zones de structure secondaire formées d'hélices α et de feuillets β, unies par des boucles, se replient dans la conformation naturelle de la protéine. On a représenté la chaîne polypeptidique sous forme de ruban, les hélices α sous forme de spires et les feuillets β sous forme de larges flèches.

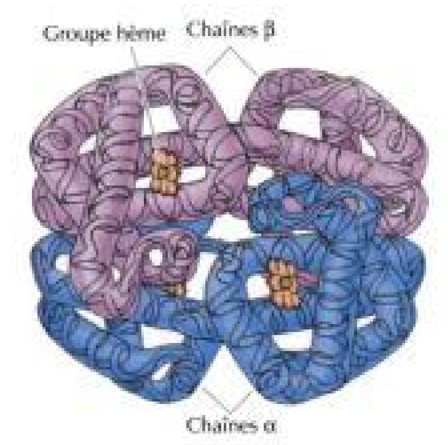
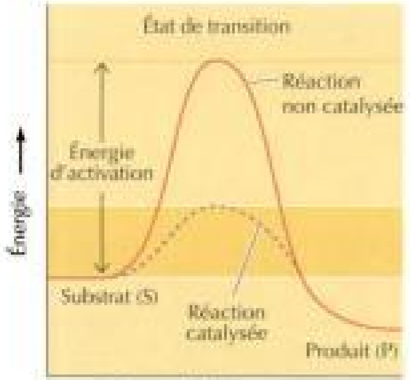


Figure 2.21
Structure quaternaire de l'hémoglobine. L'hémoglobine se compose de quatre chaînes polypeptidiques, enroulées chacune autour d'un groupe hème ; les deux chaînes α et les deux chaînes β sont identiques.

Figure 2.22
Diagramme des variations d'énergie dans les réactions sans et avec catalyseur. Ce schéma réactionnel est la simple conversion d'un substrat S en un produit P. Comme le niveau énergétique final de P est inférieur à celui de S, la réaction s'effectuera de gauche à droite, mais pour qu'elle se produise, S doit d'abord passer par un état de transition d'énergie élevée. L'énergie requise pour atteindre cet état de transition (l'énergie d'activation) est la barrière qui freine la réaction et, ce faisant, détermine la vitesse à laquelle la réaction progresse. En présence d'un catalyseur (par exemple, un enzyme) l'énergie d'activation est réduite et la réaction s'effectue à vitesse accrue.



philes sa surface, où ils s'associent aux molécules d'eau. Le cœur des protéines reployées consiste donc principalement en résidus d'acide aminé hydrophobes, arrangés sous formes d'hélices α et de feuillets β ; ces structures secondaires sont poussées au cœur hydrophobe des protéines parce que la formation de liaisons hydrogène y neutralise le caractère polaire des groupes =CO et =NH du squelette de la chaîne polypeptidique. Les boucles reliant ces éléments de structure secondaire gisent à la surface des protéines reployées, où les composants polaires du squelette partagent des liaisons avec l'eau ou avec les groupes polaires des chaînes latérales des résidus hydrophiles. Les interactions entre les groupes polaires de ces chaînes latérales (liaisons hydrogène et liaisons ioniques) jouent aussi un rôle important dans la formation des structures tertiaires. En outre, les liaisons disulfure covalentes formées entre les groupes sulhydryle des résidus de cystéine stabilisent la structure reployée des protéines de sécrétion ou de celles qui s'implantent à la surface de la cellule.

Le quatrième niveau de structure protéique, la **structure quaternaire**, repose sur des interactions entre les différentes chaînes polypeptidiques (protomères) d'une protéine multimérique. Ainsi, l'hémoglobine comprend quatre chaînes polypeptidiques maintenues associées par le type même d'interactions qui consolide leur structure tertiaire (figure 2.21).

Les traits chimiques distinctifs des 20 acides aminés composant une protéine expliquent donc le grand nombre de variantes de conformation tridimensionnelle des protéines reployées ; aussi les protéines sont-elles une catégorie de macromolécules complexes et diversifiées à l'extrême, adaptées chacune à l'une des nombreuses tâches requises par la physiologie cellulaire.

RÔLE CENTRAL DES ENZYMES EN TANT QUE CATALYSEURS BIOLOGIQUES

La tâche maîtresse d'un grand nombre de protéines est d'agir comme enzymes, les catalyseurs qui augmentent la vitesse de presque toutes les réactions chimiques se passant dans la cellule. Bien que certains ARN soient capables de catalyser quelques réactions, la plupart des réactions biochimiques sont catalysées par des protéines. S'il n'existait pas de catalyse enzymatique, la plupart des réactions biochimiques seraient tellement lentes qu'elles ne se passeraient pas dans les conditions douces de température et de pression compatibles avec la vie ; les enzymes accélèrent ces réactions de plus d'un million de fois, de sorte que des réactions qui prendraient des années en l'absence de catalyseur, s'effectuent en une fraction de seconde en présence de l'enzyme approprié. Une cellule contient des milliers d'enzymes différents, dont l'activité spécifie lesquelles, parmi les nombreuses réactions chimiques possibles, auront lieu dans la cellule.

Activité catalytique des enzymes

Comme tous les autres catalyseurs, les **enzymes** possèdent deux traits fondamentaux : premièrement, ils augmentent la vitesse d'une réaction chimique sans être eux-mêmes utilisés ou modifiés de façon définitive par la réaction, ensuite, ils augmentent la vitesse d'une réaction sans modifier l'équilibre chimique entre réactifs et produits de la réaction.

Illustrons ces principes de la catalyse enzymatique par cet exemple, dans lequel une molécule sensible à un enzyme (appelée **substrat** (*S*)) est transformée en un **produit** (*P*) par la réaction. En l'absence d'enzyme, on peut écrire la réaction comme suit :

$$S \rightleftharpoons P$$

L'équilibre chimique entre *S* et *P* est fixé par les lois de la thermodyna-

mique (exposées plus à fond dans la section suivante de ce chapitre) et s'exprime par le rapport de la vitesse de la réaction directe à celle de la réaction inverse (respectivement $S \rightarrow P$ et $P \rightarrow S$). L'enzyme approprié présent, la conversion de S en P est accélérée, mais l'équilibre entre S et P n'est pas modifié ; il faut donc que l'enzyme accélère la réaction directe et la réaction inverse d'un même facteur. On écrit la réaction comme ceci :

$$S \overset{E}{\rightleftharpoons} P$$

Notons que l'enzyme (E) n'étant pas modifié par la réaction, l'équilibre chimique n'est pas déplacé, car il dépend uniquement des propriétés thermodynamiques de S et de P.

L'influence de l'enzyme sur cette réaction se manifeste le mieux par les variations d'énergie qui doivent accompagner la conversion de S en P (figure 2.22). L'équilibre de la réaction est fixé par l'état énergétique final de S et de P, qui n'est pas changé par la catalyse enzymatique. Néanmoins, pour que la réaction se produise, le substrat doit d'abord être propulsé dans un état énergétique supérieur appelé **état de transition**. L'énergie requise pour atteindre cet état de transition (l'**énergie d'activation**) constitue une barrière qui empêche la réaction d'avancer, donc qui la ralentit ; en diminuant l'énergie d'activation, les enzymes et les autres catalyseurs augmentent la vitesse de la réaction, d'un facteur qui est le même pour la réaction directe et pour la réaction inverse, car toutes deux doivent passer par le même état de transition.

L'activité catalytique d'un enzyme passe par la fixation de son ou ses substrats, pour former un complexe enzyme-substrat (ES). Le substrat se fixe à un endroit précis de l'enzyme, appelé **site actif**. Pendant qu'il est fixé au site actif, le substrat est transformé en produit de la réaction, qui quitte alors l'enzyme. On écrit la réaction catalysée par l'enzyme comme ceci :

$$S + E \rightleftharpoons ES \rightleftharpoons E + P$$

Notons que, E se retrouvant inchangé au deux bouts de l'équation, l'équilibre n'est pas influencé par l'enzyme. Néanmoins l'enzyme offre une surface sur laquelle les réactions transformant S en P se passent plus facilement ; ceci est dû aux interactions entre l'enzyme et le substrat, qui abaissent l'énergie d'activation et favorisent la formation de l'état de transition.

Mécanisme de la catalyse enzymatique

La fixation d'un substrat au site actif d'un enzyme est une interaction très spécifique. Les sites actifs sont des puits ou des sillons creusés à la surface des enzymes et constitués en général par différentes parties de la chaîne polypeptidique ayant convergé quand son reploiement a construit la structure tertiaire. Un substrat s'attache au site actif par des liaisons non covalentes, dont des liaisons hydrogène, ioniques, et des interactions hydrophobes. Une fois le substrat fixé au site actif de l'enzyme, sa conversion en produit est accélérée par plusieurs types de mécanismes catalytiques.

L'exemple simple que nous venons de décrire ne faisait intervenir qu'un seul substrat, mais la plupart des réactions biochimiques portent sur deux ou plus de deux substrats différents ; la liaison peptidique, par exemple, se forme par union de deux acides aminés. Dans ces cas, la fixation de deux substrats, ou plus, au site actif, dans la position et l'orientation appropriées, accélère la réaction (figure 2.23). L'enzyme offre un moule dans lequel les réactifs se logent et s'orientent de façon à favoriser l'état de transition, dans lequel ils vont entrer en contact.

Un enzyme accélère aussi une réaction en modifiant la conformation de son substrat de façon à ce qu'elle s'approche de la conformation de l'état de

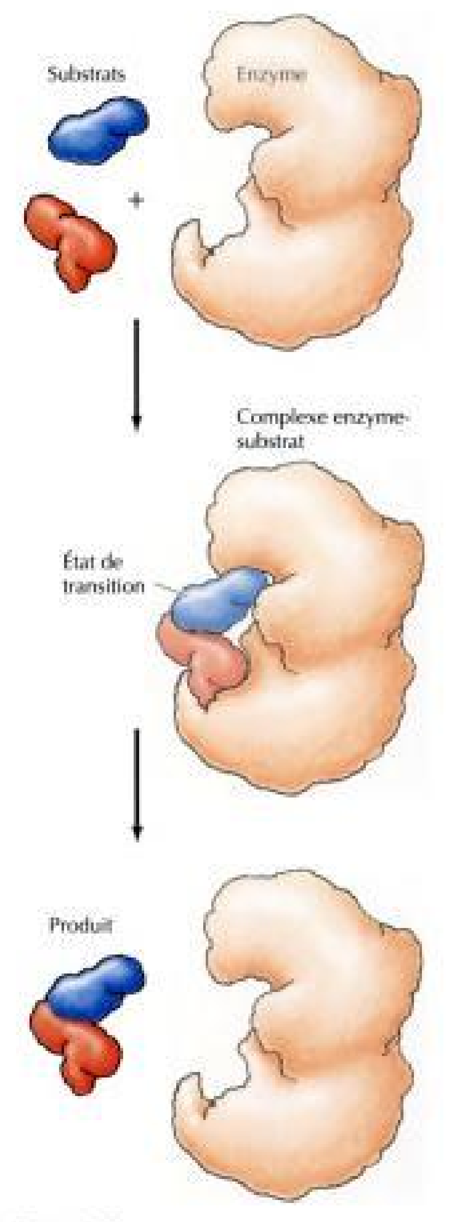
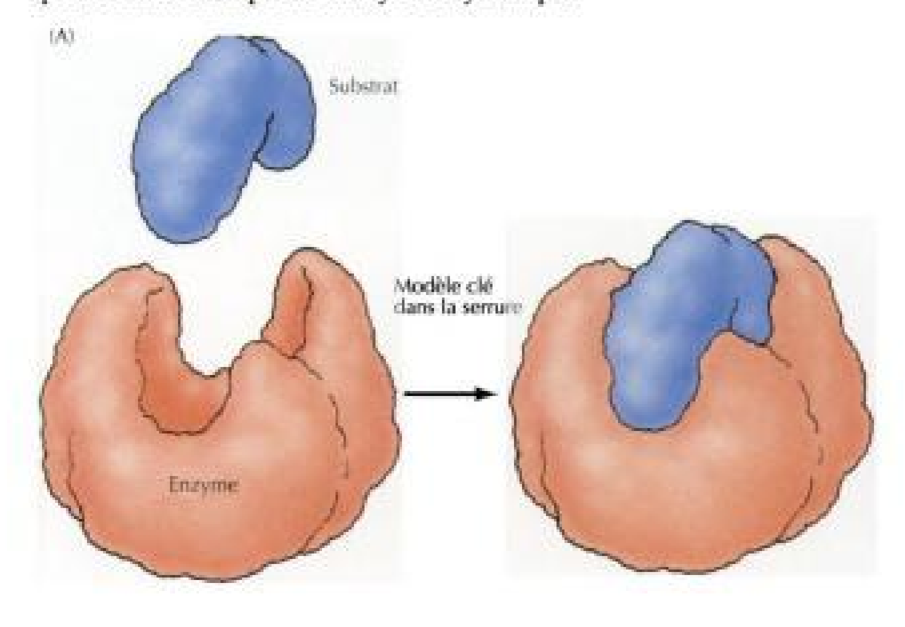


Figure 2.23
Catalyse enzymatique d'une réaction entre deux substrats. L'enzyme présente un moule dans lequel les deux substrats sont mis en contact dans la position et l'orientation la plus adéquate à leur réaction.

transition. Le modèle le plus simple d'interaction enzyme-substrat est celui de la **clé dans la serrure** : l'enzyme s'adapte exactement au site actif (figure 2.24). Cependant, il arrive souvent que la conformation tant du substrat que de l'enzyme se modifie au moment où le substrat se fixe, un processus appelé **ajustement induit** ; dans ce cas, la conformation du substrat tend à ressembler plus étroitement à celle qu'il atteindra dans l'état de transition. En affaiblissant certaines liaisons critiques, la tension produite par cette distorsion du substrat facilite son basculement vers l'état de transition ; de plus, l'état de transition est stabilisé par la fixation solide du substrat à l'enzyme, ce qui abaisse l'énergie d'activation requise pour que la réaction se produise.

Outre qu'ils mettent plusieurs substrats en contact et en modifient la conformation pour la rapprocher de celle de l'état de transition, beaucoup d'enzymes prennent directement part au processus catalytique ; c'est alors que certaines chaînes latérales de résidus d'acide aminé du site actif réagissent avec le substrat et forment des liaisons avec les intermédiaires de la réaction. Ces mécanismes catalytiques mettent souvent en jeu des acides aminés acides et basiques, comme dans le cas de la chymotrypsine prise ci-après comme exemple de catalyse enzymatique.



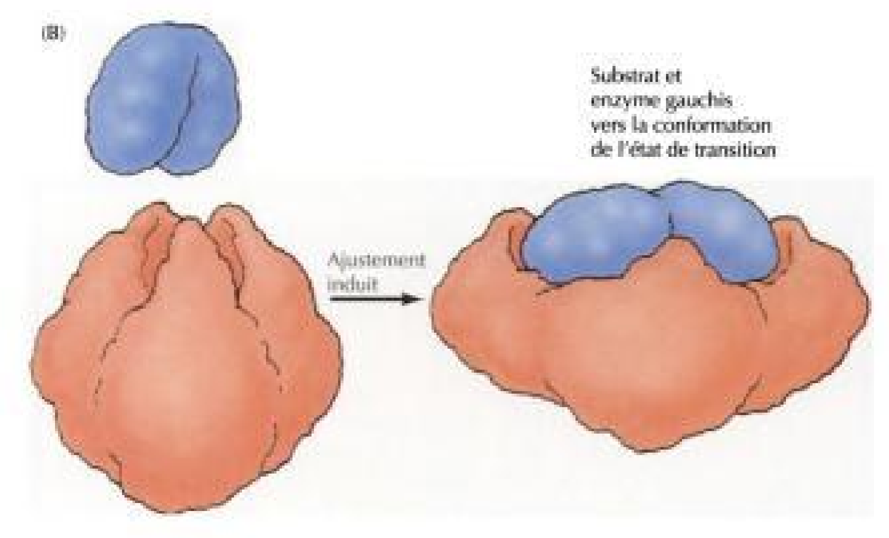
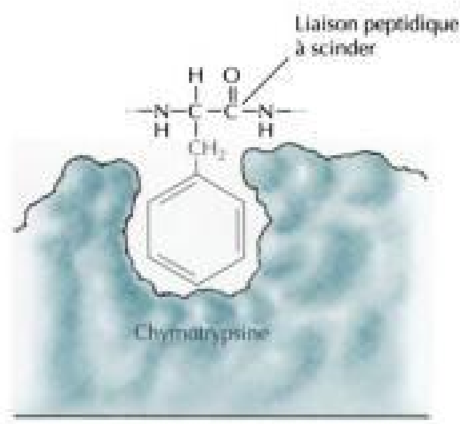


Figure 2.24
Modèles d'interaction enzyme-substrat. (A) Dans le modèle de la « clé dans la serrure », le substrat s'adapte exactement au site actif de l'enzyme. (B) Dans le modèle de l'ajustement induit, le substrat, en se fixant, modifie la conformation de l'enzyme ainsi que la sienne propre. Ces distorsions rapprochent la conformation du substrat de celle de l'état de transition, ce qui accélère la réaction.



Interaction hydrophobe

Trypsine
Asp

Interaction ionique

Figure 2.25
Fixation d'un substrat aux protéases à sérine active. Le résidu d'acide aminé voisin de la liaison à couper s'insinue dans une poche comportant le site actif de l'enzyme. Dans la chymotrypsine, la poche attire les résidus d'acide aminé hydrophobes ; la poche de liaison de la trypsine comporte un résidu d'aspartate chargé négativement, qui forme une liaison ionique avec un acide aminé basique.

La chymotrypsine fait partie des enzymes protéasiques à sérine active, qui décomposent les protéines en hydrolysant leurs liaisons peptidiques selon la réaction :

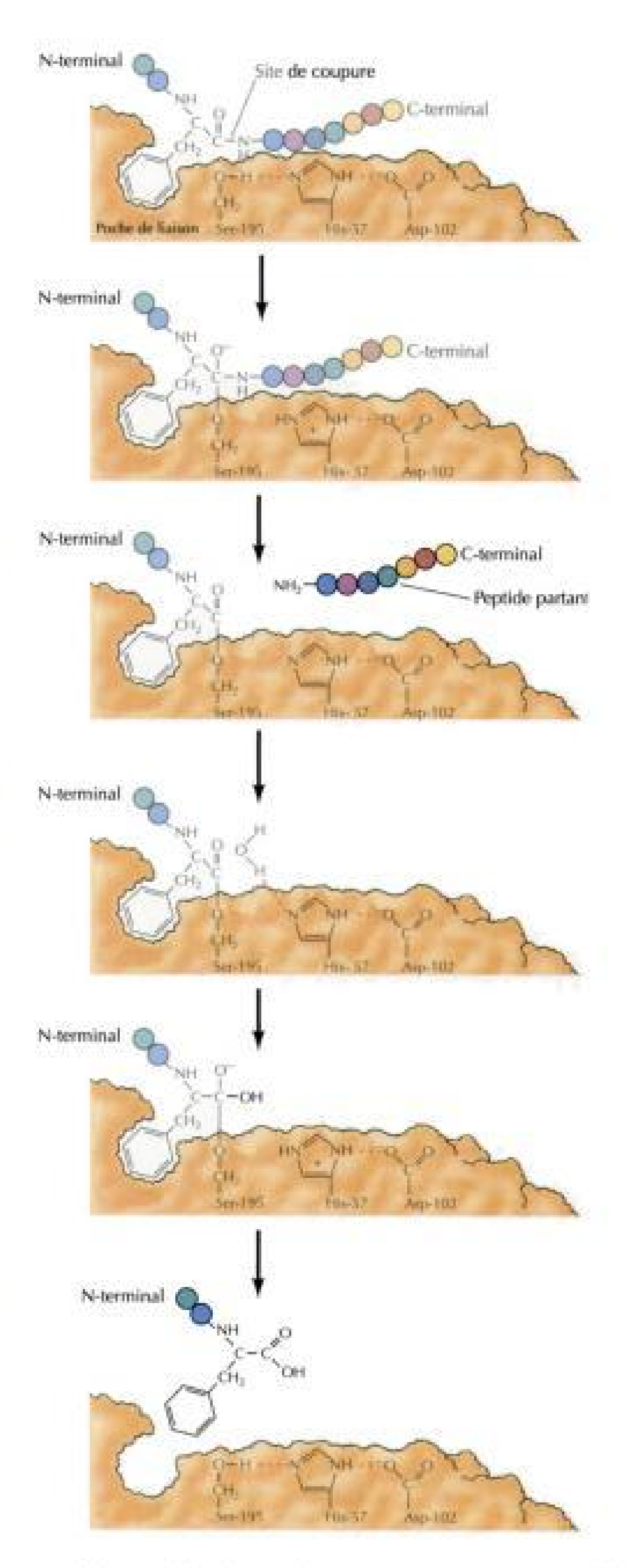
$$\text{Protéine} + H_2O \rightarrow \text{Peptide}_1 + \text{Peptide}_2$$

Les membres de la famille des protéases à sérine active (chymotrypsine, trypsine, élastase et thrombine) ont chacun leur propre substrat et scindent la chaîne au voisinage d'un résidu particulier ; ainsi, la chymotrypsine coupe contre des résidus hydrophobes, comme le tryptophane et la phénylalanine, la trypsine contre des résidus basiques, comme la lysine et l'arginine. Cependant, toutes les protéases à sérine active se ressemblent par leur structure et utilisent le même mécanisme catalytique. Le site actif de ces enzymes comporte trois acides aminés cruciaux, une sérine, une histidine et un aspartate, qui effectuent l'hydrolyse de la liaison peptidique ; on a affaire à des protéinases à sérine active parce que c'est le résidu de sérine qui joue le rôle principal.

Les substrats se fixent aux protéinases à sérine active en insérant leur résidus d'acide aminé entourant le site à couper dans une poche du site actif de l'enzyme (figure 2.25). La nature de cette poche détermine l'espèce de substrat qui sera accepté par chacun des membres de la famille de ces protéases ; ainsi, la poche de la chymotrypsine est bordée d'acides aminés hydrophobes qui entrent en contact avec les chaînes latérales hydrophobes de ses substrats les meilleurs ; celle de la trypsine, par contre, contient un acide aminé acide chargé négativement (l'aspartate), prêt à former une liaison ionique avec les résidus lysine ou arginine du substrat.

La fixation du substrat place la liaison peptidique à scinder contre la sérine du site actif (figure 2.26). Le proton de cette sérine passe alors sur l'histidine du site actif ; la conformation du site actif favorise ce transfert de proton car l'histidine interagit avec la charge négative du résidu aspartate. Ensuite la sérine réagit avec le substrat, en formant un état de transition tétraédrique. La liaison se rompt, avec départ du fragment C-terminal du peptide, alors que son fragment N-terminal reste fixé à la sérine. Une molécule d'eau (le second substrat) accède alors au site actif et renverse les premières étapes de la réaction : un proton de la molécule d'eau passe sur l'histidine et son groupe hydroxyle est transféré au peptide, pour former un second état de transition tétraédrique ; le proton repasse de l'histidine à la sérine et la réaction se termine quand le peptide quitte l'enzyme.

Figure 2.26
Mécanisme de la catalyse par la chymotrypsine.
Trois acides aminés du site actif (Sér-195, His-57 et Asp-102) jouent un rôle clé dans le processus catalytique.



Sér-195 donne H^+ à His-57 et forme un état de transition tétraédrique avec le substrat. Asp-102 stabilise le transfert de H^+ à His-57 *via* une interaction ionique.

H^+ passe de His-57 au substrat; coupure de la liaison peptidique.

L'eau accède au site actif en formant une liaison hydrogène avec His-57.

H_2O donne un H^+ à His-57 et son OH^- au substrat, en formant un autre état de transition tétraédrique.

H^+ repasse de His-57 à Sér-195; le peptide N-terminal quitte l'enzyme.

Cet exemple illustre plusieurs traits saillants de la catalyse enzymatique : la spécificité des interactions enzyme-substrat, l'ajustement de plusieurs molécules de substrat dans le site actif et l'intervention de résidus du site actif dans la formation et la stabilisation de l'état de transition. Bien que des milliers d'enzymes cellulaires catalysent un grand nombre de types de réactions chimiques, leur action repose toujours sur les mêmes principes de base.

Coenzymes

Ce ne sont pas seulement les substrats qui se lient au site actif des enzymes, mais aussi d'autres petites molécules qui prennent part à la catalyse. Les **groupes prosthétiques** sont de petites molécules liées aux protéines, dans lesquelles ils tiennent un rôle indispensable ; l'oxygène véhiculé par la myoglobine et l'hémoglobine, par exemple, est fixé sur l'hème, leur groupe prosthétique. Souvent, des ions métalliques (comme le zinc ou le fer) sont attachés aux enzymes, où ils jouent un rôle clé dans le processus de catalyse. En outre, diverses molécules organiques de petite masse moléculaire participent à certains types de réactions enzymatiques : on les appelle **coenzymes**, parce qu'ils agissent de concert avec les enzymes pour accélérer les réactions. Contrairement aux substrats, les coenzymes ne sont pas transformés de manière irréversible par les réactions auxquelles ils participent, mais sont recyclés en acceptant l'une à la suite de l'autre de nombreuses molécules de substrat.

Les coenzymes servent à transporter divers types de groupes chimiques. Un coenzyme bien représenté est le **dinucléotide de nicotinamide adénine (NAD^+)** qui fonctionne comme transporteur d'électrons dans les réactions d'oxydo-réduction (figure 2.27). NAD^+ accepte un ion hydronium (H^+) et deux électrons (e^-) d'un substrat, en donnant NADH. Ce dernier peut céder alors ces électrons à un autre substrat, en reformant NAD^+. Celui-ci aura donc transféré les électrons d'un substrat (qui s'est oxydé) à un autre substrat (qui s'est réduit).

Figure 2.27
Rôle de NAD^+ dans les réactions d'oxydo-réduction. (A) Le nicotinamide-adénine dinucléotide (NAD^+) sert de transporteur d'électrons dans les réactions d'oxydo-réduction en acceptant deux électrons (e^-) et un proton (H^+) pour former NADH. (B) NAD^+, par exemple, peut accepter des électrons d'un substrat (S1), en donnant S1 oxydé plus NADH ; le NADH formé dans cette réaction peut transférer ses électrons à un autre substrat (S2) et redevenir NAD^+. Le bilan net est un transfert d'électrons (portés par NAD^+) de S1 (qui s'oxyde) à S2 (qui se réduit).

Tableau 2.1 Exemples de coenzymes et de vitamines

Coenzyme	Vitamine apparentée	Réaction chimique
NAD^+ ; $NADP^+$	Niacine	Oxydo-réductions
FAD	Riboflavine (B_2)	Oxydo-réductions
Pyrophosphate de thiamine	Thiamine (B_1)	Transfert de groupe aldéhydique
Coenzyme A	Pantothénate	Transfert de groupe acyle
Tétrahydrofolate	Folate	Transfert de groupe monocarboné
Biotine	Biotine	Carboxylation
Phosphate de pyridoxal	Pyridoxal (B_6)	Transamination

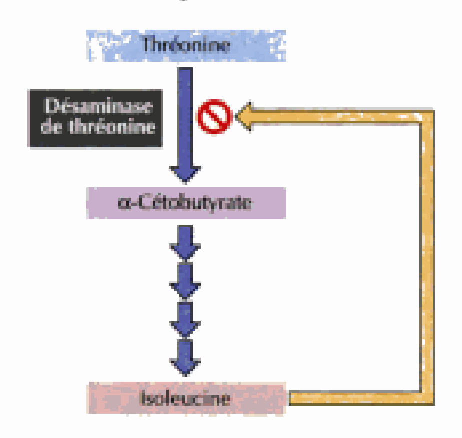
Certains coenzymes servent aussi de transporteurs d'électrons, d'autres sont en jeu dans le transfert d'une série d'autres groupes chimiques (par exemple, les groupes carboxyle et acétyle : tableau 2.1). Tel coenzyme peut fonctionner dans différents enzymes pour catalyser le transfert de groupes chimiques particuliers entre tout une panoplie de substrats. Beaucoup de coenzymes sont étroitement apparentés à l'une ou l'autre vitamine, qui contribue à une partie de la structure du coenzyme, parfois à l'ensemble du coenzyme. Les bactéries comme *E. coli* peuvent se passer de vitamines, mais celles-ci sont des composants indispensables du régime alimentaire de l'Homme et des autres animaux supérieurs, qui ne sont plus capables de synthétiser ces vitamines.

Régulation de l'activité enzymatique

Un caractère frappant de la plupart des enzymes est que leur activité n'est pas constante, mais peut être modifiée de façon à répondre de façon appropriée aux besoins physiologiques de toute espèce, besoins qui varient durant la vie d'une cellule.

Un type bien connu de régulation enzymatique est **la rétro-inhibition**, dans laquelle le produit final d'une voie métabolique inhibe l'activité d'un enzyme intervenant dans la synthèse de ce produit. Un acide aminé, l'isoleucine par exemple, est synthétisée par une série de réactions partant d'un autre acide aminé, la thréonine (figure 2.28) ; la première étape de cette voie est catalysée par la désaminase de la thréonine, un enzyme inhibé par l'isoleucine le produit final. Une fois l'isoleucine montée à un certain taux dans la cellule, elle inhibe la désaminase de la thréonine et bloque une nouvelle synthèse d'isoleucine. Dès que la concentration d'isoleucine s'abaisse, l'inhibition par rétroaction est levée, la désaminase de la thréonine n'est plus inhibée et la synthèse d'isoleucine reprend. Grâce à cet ajustement de l'activité de la désaminase de la thréonine, la cellule ne synthétise que la quantité d'isoleucine requise, en évitant tout gaspillage d'énergie pour une synthèse d'isoleucine superflue.

Figure 2.28
Rétro-inhibition. La première étape de la conversion de thréonine en isoleucine est catalysée par la désaminase de la thréonine. L'activité de cet enzyme est inhibée par l'isoleucine, le produit final de cette voie métabolique.



Cette rétro-inhibition est un exemple de **régulation allostérique**, dans laquelle l'activité de l'enzyme est commandée par la fixation de petites molécules aux sites régulateurs de l'enzyme (figure 2.29). Le terme de « régulation allostérique » vient de ce que les molécules régulatrices ne se fixent pas au site catalytique, mais en un autre (*allos*) site (*steric*) de la protéine ; en se fixant, la molécule régulatrice modifie la conformation de la protéine, ce qui change la forme de son site actif ainsi que l'activité catalytique de l'enzyme. Dans le cas de la désaminase de la thréonine, la fixation de la molécule régulatrice (l'isoleucine) inhibe l'enzyme ; dans d'autres cas, la molécule régulatrice sert d'activateur et stimule l'enzyme cible au lieu de l'inhiber.

Il arrive que l'activité d'un enzyme soit ajustée par des interactions avec d'autres protéines ou par modification covalente, par exemple l'addition

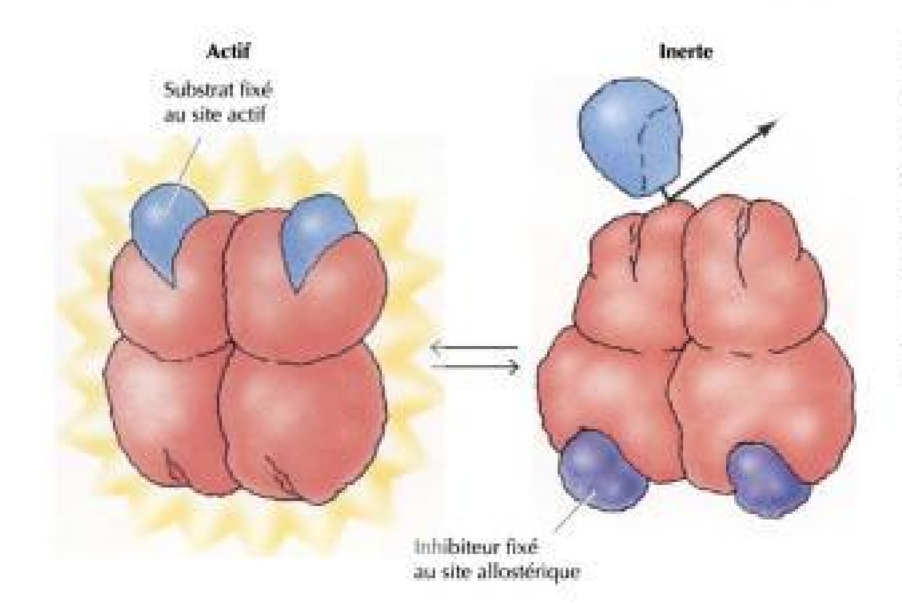


Figure 2.29
Régulation allostérique. Ici, l'activité enzymatique est inhibée par la fixation d'une molécule régulatrice à un site allostérique. En l'absence d'inhibiteur, le substrat se fixe au site actif de l'enzyme et la réaction s'effectue. La fixation d'un inhibiteur au site allostérique induit un changement de conformation dans l'enzyme et empêche le substrat de se fixer. La plupart des enzymes allostériques sont composés de plusieurs protomères.

d'un groupe phosphate à un résidu sérine, thréonine ou tyrosine. Pareille **phosphorylation** est un mécanisme tout à fait courant pour moduler l'activité enzymatique ; l'addition d'un groupe phosphate stimule ou inhibe l'activité de beaucoup d'enzymes (figure 2.30). Ainsi, les cellules musculaires répondent à l'adrénaline en dégradant plus vite leur glycogène en glucose, source d'énergie pour une activité musculaire accrue. Le découpage du glycogène est catalysé par la glycogène phosphorylase, qui est activée par phosphorylation en réponse à la fixation d'adrénaline sur un récepteur siégeant à la surface de la cellule musculaire. La phosphorylation des protéines joue un rôle crucial en modulant non seulement les réactions métaboliques, mais aussi de nombreuses autres fonctions cellulaires, notamment la prolifération et la différenciation des cellules.

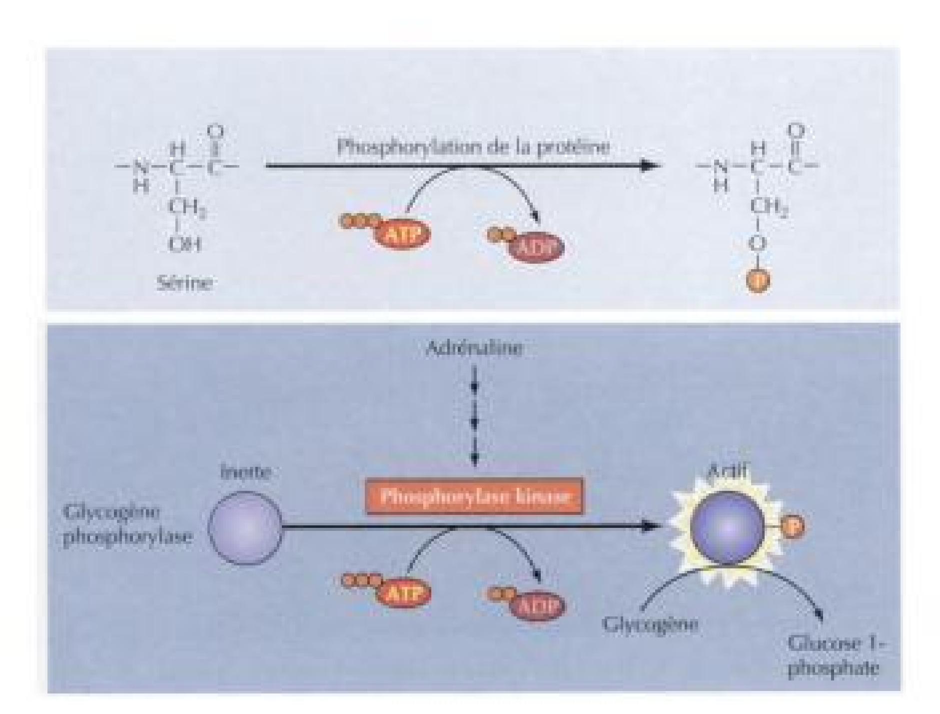


Figure 2.30
Phosphorylation d'une protéine. L'activité de certains enzymes est modulée par addition d'un groupe phosphate au groupe OH de la chaîne latérale d'un résidu sérine (ici), thréonine ou tyrosine. La glycogène phosphorylase, par exemple, qui catalyse la conversion de glycogène en glucose 1-phosphate, est activée par phosphorylation dès que de l'adrénaline s'attache aux cellules musculaires.

ÉNERGIE MÉTABOLIQUE

De nombreuses tâches, comme la motilité et la synthèse de macromolécules, ne s'exécutent pas sans que la cellule dépense de l'énergie ; pour en obtenir, la cellule consacre d'ailleurs une bonne partie de ses activités à récupérer l'énergie du milieu. Bien que les enzymes déterminent la vitesse de presque toutes les réactions chimiques dans la cellule, la position d'équilibre de ces réactions n'est pas modifiée par la catalyse enzymatique ; ce sont les lois de la thermodynamique qui gouvernent les équilibres chimiques et fixent le sens énergétiquement favorable de toutes les réactions. Nombreuses sont les réactions intracellulaires qui, étant défavorisées au point de vue thermodynamique, requièrent une dépense d'énergie pour se dérouler. Aussi, les cellules sont-elles condamnées à dépenser constamment l'énergie qu'elles pompent du milieu environnant. Obtenir et dépenser l'énergie métabolique sont donc les piliers de la biologie cellulaire.

Énergie libre et ATP

On présente le mieux l'énergétique des réactions biochimiques en se référant à la fonction thermodynamique appelée **énergie libre de Gibbs** (*G*), du nom de Josiah Willard Gibbs. La variation d'énergie libre (ΔG) d'une réaction combine les effets de la variation d'enthalpie (ΔH, la chaleur libérée ou absorbée dans une réaction chimique) et la variation d'entropie (ΔE, le degré de désordre ou d'ordre causé par une réaction), de façon à prévoir si une réaction est possible ou non. Toutes les réactions énergétiquement favorisées se produisent spontanément, avec une perte d'énergie libre ($\Delta G < 0$). Considérons la réaction où A se transforme en B :

$$A \rightleftharpoons B$$

Si $\Delta G < 0$, la réaction va progresser dans le sens direct, comme on l'a écrite, mais si $\Delta G > 0$, la réaction tendra à aller dans le sens inverse et B à se transformer en A.

Le ΔG d'une réaction ne dépend pas seulement des propriétés elles-mêmes des réactifs et des produits, mais aussi de leur concentration et d'autres conditions de la réaction (température, par exemple) ; c'est pourquoi il est utile de définir une variation d'énergie libre dans des conditions de référence (standard)(par convention : tous les réactifs et produits à la concentration de 1 M à une pression de 1 atm). La variation d'énergie libre standard ($\Delta G°$) d'une réaction est directement en rapport avec à sa position d'équilibre puisque le ΔG vrai est à la fois fonction de $\Delta G°$ et de la concentration des réactifs et des produits. Ainsi dans la réaction

$$A \rightleftharpoons B$$

on peut écrire la variation d'énergie selon l'équation

$$\Delta G = \Delta G° + RT\ln [B]/[A]$$

dans laquelle R est la constante des gaz, T la température absolue et [A] et [B] les concentrations molaires de A et de B.

À l'équilibre, $\Delta G = 0$ et la réaction globale ne va dans un sens ni dans l'autre. La constante d'équilibre de la réaction ($K = [B]/[A]$ à l'équilibre) est directement en relation avec $\Delta G°$ par l'équation précédente, qu'on peut transformer comme suit :

$$0 = \Delta G° + RT \ln K$$

ou

$$\Delta G° = - RT \ln K$$

Si le rapport réel [B]/[A] est supérieur au rapport à l'équilibre (K), $\Delta G > 0$ et la réaction progresse en sens inverse (de B vers A) ; dans le cas contraire, si le rapport [B]/[A] est inférieur au rapport à l'équilibre, $\Delta G < 0$, et A se transforme en B.

La variation standard d'énergie libre d'une réaction ($\Delta G°$) fixe donc son point d'équilibre chimique et prévoit le sens dans lequel va progresser la réaction, quelles que soient les conditions dans lesquelles elle se déroule. Dans les réactions biochimiques, on exprime la variation standard d'énergie libre sous forme de $\Delta G°'$, qui est la variation standard d'énergie libre d'une réaction en solution aqueuse à pH = 7, condition prévalant dans la cellule.

Dans les conditions régnant dans le milieu cellulaire, beaucoup de réactions biochimiques (par exemple, la synthèse de macromolécules) sont thermodynamiquement défavorisées ($\Delta G > 0$). Pour que ces réactions se passent, il faut injecter de l'énergie dans la réaction. Ainsi, dans la réaction

$$A \rightleftharpoons B \qquad \Delta G = +\ 10\ \text{kcal/mol}$$

la conversion de A en B est défavorisée au point de vue énergétique et la réaction va en sens inverse, de B en A. On peut cependant faire aller la réaction dans le sens direct, en la couplant à une réaction énergétiquement favorisée, telle que

$$C \rightleftharpoons D \qquad \Delta G = -\ 20\ \text{kcal/mol}$$

Si on combine ces deux réactions, on obtient

$$A + C \rightleftharpoons B + D \qquad \Delta G = -\ 10\ \text{kcal/mol}$$

Le ΔG de la combinaison des deux réactions étant la somme des variations d'énergie libre de chaque composante, la réaction couplée est énergétiquement favorisée et se déroulera dans le sens indiqué. On voit donc que la transformation défavorisée de A en B est entraînée par couplage à une autre réaction comportant une grande perte d'énergie libre. Les enzymes sont capables d'effectuer de semblables réactions couplées de manière coordonnée.

La cellule met à profit ces lois fondamentales pour entraîner les nombreuses réactions énergiquement défavorisées qu'exigent les systèmes biologiques. Le **triphosphate d'adénosine (ATP)** tient un rôle central dans ce processus car il sert de réservoir d'énergie libre intracellulaire (figure 2.31). Les liaisons séparant les groupes phosphoryle de l'ATP sont des **liaisons riches en énergie**, car leur rupture s'accompagne d'une perte relativement grande d'énergie libre. Ces liaisons chimiques n'ont rien de caractéristique en elles-mêmes ; elles portent ce nom parce qu'une quantité relativement élevée d'énergie libre est libérée par leur rupture dans la cellule. Dans l'hydrolyse d'un ATP en ADP et phosphate (P_i), $\Delta G°' = -\ 7{,}3$ kcal/mol. N'oublions pas, cependant, que $\Delta G°'$ se rapporte aux conditions standard, où la concentration des réactifs et des produits est égale à 1 M ; la concentration régnant dans la cellule est d'environ 10^{-2} M pour P_i, celle d'ATP dépasse celle d'ADP. Ces différences entre les concentrations intracellulaires et celles de référence favorisent l'hydrolyse d'ATP, de telle sorte que celle-ci s'accompagne d'un ΔG d'environ - 12 kcal/mol.

L'ATP peut aussi bien se rompre en AMP et pyrophosphate (PP_i), en livrant à peu près la même quantité d'énergie libre que la rupture d'ATP en ADP, mais le pyrophosphate produit est lui-même rapidement hydrolysé, avec un ΔG similaire à celui de la rupture d'ATP. Aussi, la variation totale d'énergie libre de rupture d'un ATP en AMP est-elle environ double de celle accompagnant la rupture d'un ATP en ADP. Par comparaison, la liaison entre le sucre et le groupe phosphate de l'AMP n'est pas une liaison

Figure 2.31
L'ATP est une réserve d'énergie libre. On qualifie de riches en énergie les liaisons entre les groupes phosphoryle de l'ATP parce que leur rupture s'accompagne d'une diminution importante d'énergie libre. L'hydrolyse de l'ATP peut donner de l'ADP plus du phosphate (HPO_4^{2-}) ou de l'AMP plus du pyrophosphate ; dans ce cas, le pyrophosphate est lui-même rapidement hydrolysé, avec perte d'une autre quantité d'énergie libre.

riche, mais une liaison covalente classique, avec une énergie d'hydrolyse $\Delta G^{\circ\prime}$ de - 3,3 kcal/mol.

Grâce à la perte d'énergie libre concomitante, la rupture d'un ATP sert à entraîner d'autres réactions cellulaires exigeant de l'énergie. La première réaction de la glycolyse, par exemple (exposée dans la section suivante), est la conversion de glucose en glucose 6-phosphate. On écrit la réaction théorique comme suit :

$$\text{Glucose} + \text{phosphate } (HPO_4^{2-}) \rightarrow \text{Glucose 6-phosphate} + H_2O$$

Comme cette réaction est énergétiquement interdite telle qu'on l'a écrite ($\Delta G^{\circ\prime}$ = + 3,3 kcal/mol), la rupture d'un ATP dans une réaction couplée ($\Delta G^{\circ\prime}$ = - 7,3 kcal/mol) doit pousser la réaction du glucose dans le sens direct :

$$ATP + H_2O \rightarrow ADP + HPO_4^{2-}$$

En combinant les deux réactions, on obtient :

$$\text{Glucose} + ATP \rightarrow \text{Glucose 6-phosphate} + ADP$$

La variation d'énergie libre de cette réaction étant la somme des variations d'énergie libre de chaque réaction isolée, le $\Delta G^{\circ\prime}$ de la réaction couplée vaut - 4,0 kcal/mol, ce qui favorise la formation de glucose 6-phosphate.

D'autres molécules, notamment d'autres triphosphates de nucléotide (par exemple, le GTP) possèdent aussi des liaisons d'énergie libre élevée et servent, comme l'ATP, à entraîner des réactions consommatrices d'énergie. C'est cependant l'ATP qui donne son énergie libre dans la plupart des réactions ; aussi la plupart des réactions productrices d'énergie sont-elles couplées à la synthèse d'ATP, alors que les réactions consommatrices d'énergie sont couplées à l'hydrolyse d'ATP. Comme forme utilisable et accumulable d'énergie libre, les liaisons riches en énergie de l'ATP tiennent donc le rôle de plaque tournante du métabolisme cellulaire.

Formation d'ATP aux dépens de glucose

La dégradation des glucides, notamment du glucose, est une des sources principales d'énergie pour la cellule. On schématise la dégradation oxydante complète d'un glucose en CO_2 et H_2O comme suit :

$$C_6H_{12}O_6 + 6\ O_2 \rightarrow 6\ CO_2 + 6\ H_2O$$

La réaction libère une grande quantité d'énergie, car son $\Delta G^{o\prime}$ = - 686 kcal/mol. Pour rendre cette énergie libre utilisable, la cellule oxyde le glucose en plusieurs étapes couplées à la synthèse d'ATP.

La **glycolyse**, le premier stade de la dégradation du glucose, est présente dans pratiquement toutes les cellules de la biosphère. Elle se produit en l'absence d'oxygène et satisfait entièrement aux besoins en énergie métabolique des organismes anaérobies. Par contre, dans les cellules aérobies, la glycolyse n'est qu'un prélude à la dégradation du glucose.

Les réactions de la glycolyse vont du glucose au pyruvate, avec un gain net de deux molécules d'ATP (figure 2.32). À vrai dire, les étapes initiales de la glycolyse consomment de l'énergie, puisqu'elles utilisent l'ATP pour phosphoryler le glucose en glucose 6-phosphate d'abord, en fructose 1,6-*bis*phosphate ensuite. Les enzymes qui catalysent ces réactions, à savoir respectivement l'hexokinase et la phosphofructokinase, sont d'importants points d'ajustement de la voie glycolytique. L'élément pilote est la phosphofructokinase, inhibée par les concentrations élevées d'ATP. L'inhibition de la phosphofructokinase entraîne une accumulation de glucose 6-phosphate, qui à son tour inhibe l'hexokinase. Quand la cellule est bien fournie en énergie métabolique sous forme d'ATP, la dégradation de glucose est ralentie.

Les réactions qui suivent la formation de fructose 1,6-*bis*phosphate sont la partie de la voie glycolytique qui est productrice nette d'énergie. La rupture du fructose 1,6-*bis*phosphate produit deux molécules d'un sucre à trois carbones, le glycéraldéhyde 3-phosphate, qui s'oxyde en 1,3-*bis*phosphoglycérate. Comme un des groupes phosphate de ce composé possède une grande énergie libre d'hydrolyse ($\Delta G^{o\prime}$ = - 11,5 kcal/mol), il servira, à l'étape suivante, à entraîner la synthèse d'ATP à partir d'ADP. Le produit de la réaction, le 3-phosphoglycérate, est ensuite transformé en phosphoénolpyruvate, le second intermédiaire de haute énergie de la glycolyse. Le groupe phosphoryle d'énergie élevée de ce composé ($\Delta G^{o\prime}$ = -14,6 kcal/mol) est transféré à une molécule d'ATP, avec formation de pyruvate. La conversion de chaque molécule de glycéraldéhyde 3-phosphate en pyruvate est donc couplée à la production de deux molécules d'ATP ; en tout, par molécule de glucose, se forment quatre molécules d'ATP. Comme deux molécules d'ATP sont consommées dans les réactions initiales, le gain net de la glycolyse est de deux molécules d'ATP.

En dehors de sa production d'ATP, la glycolyse transforme deux molécules d'un coenzyme, NAD^+, en NADH ; NAD^+ est un agent oxydant qui accepte des électrons du glycéraldéhyde 3-phosphate ; le produit formé, NADH, doit être recyclé, en intervenant comme donneur d'électrons dans d'autres réactions d'oxydo-réduction à l'intérieur de la cellule. En anaérobiose, le NADH formé dans la glycolyse est réoxydé en NAD^+ par conversion du pyruvate en lactate ou éthanol. Chez les organismes aérobies, NADH est une source d'énergie supplémentaire, car il donne ses électrons à la chaîne de transport d'électrons, qui s'en sert pour réduire O_2 en H_2O, avec production supplémentaire d'ATP.

Dans les cellules d'eucaryotes, la glycolyse a lieu dans le cytosol ; le pyruvate formé est ensuite transporté dans les mitochondries, où son oxydation en CO_2 et H_2O fournit la plus grande partie de l'ATP obtenu par la dégradation du glucose. L'étape suivante du métabolisme du pyruvate est sa décarboyxlation oxydante en présence de **coenzyme A (CoA)**, un porteur

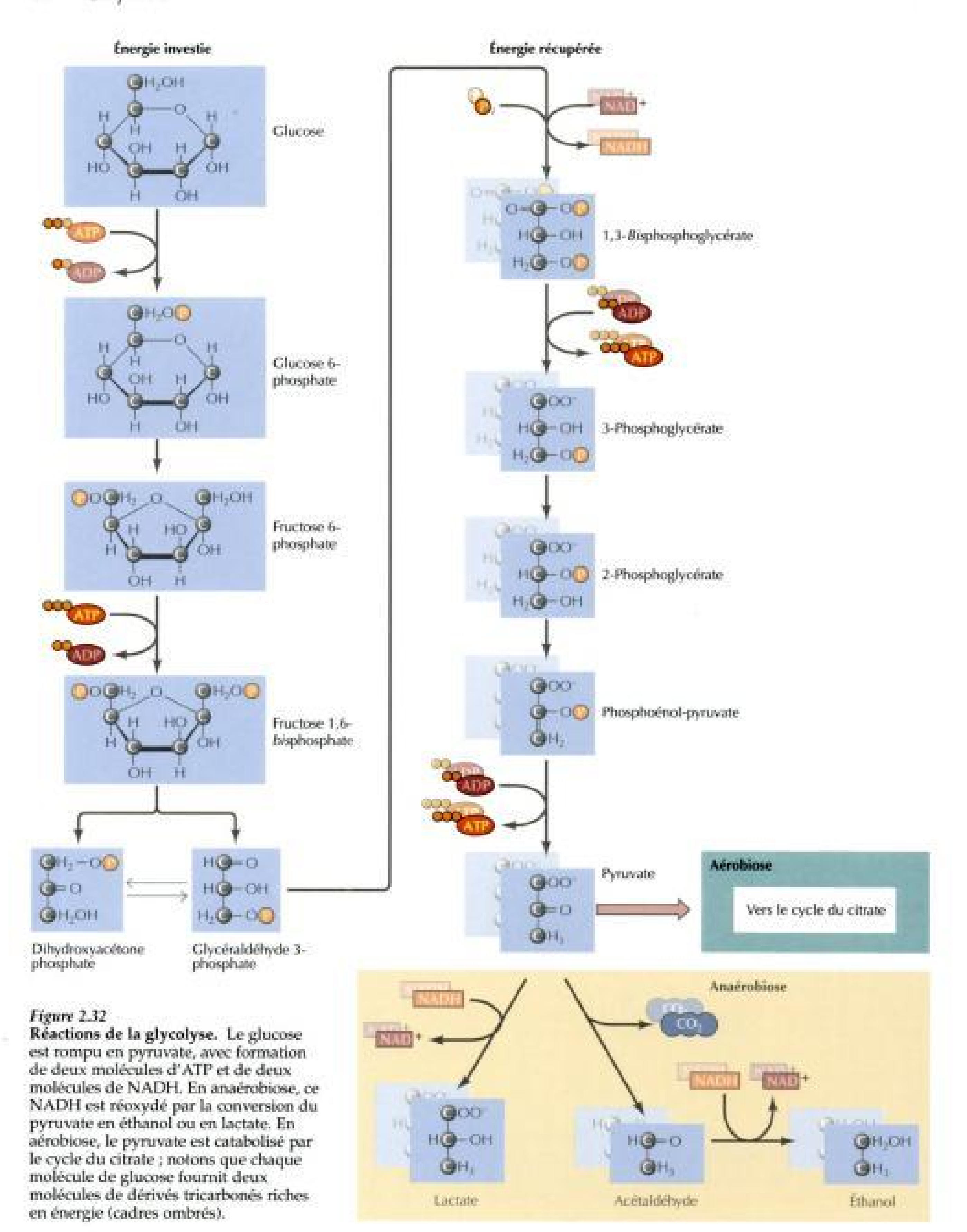


Figure 2.32
Réactions de la glycolyse. Le glucose est rompu en pyruvate, avec formation de deux molécules d'ATP et de deux molécules de NADH. En anaérobiose, ce NADH est réoxydé par la conversion du pyruvate en éthanol ou en lactate. En aérobiose, le pyruvate est catabolisé par le cycle du citrate ; notons que chaque molécule de glucose fournit deux molécules de dérivés tricarbonés riches en énergie (cadres ombrés).

Figure 2.33
Décarboxylation oxydante du pyruvate. Le pyruvate est converti en CO_2 et acétyl-CoA, avec production d'une molécule de NADH. Dans diverses réactions, le coenzyme A (CoA-SH) sert de transporteur de groupe acyle activé.

de groupes acyle dans diverses réactions métaboliques (figure 2.33) ; un des carbones du pyruvate part sous forme de CO_2 et les deux autres passent au CoA pour former l'acétylCoA, avec réduction concomitante d'une molécule de NAD^+ en NADH.

L'acétyl-CoA produit dans cette réaction entre dans le **cycle du citrate** ou **cycle de Krebs**, ou encore **cycle des acides tricarboxyliques** (figure 2.34), plaque tournante du métabolisme oxydant. Le groupe acétyle dicarboné se combine à l'oxaloacétate (4 carbones) pour former du citrate (6 carbones) ; il faut huit réactions successives pour oxyder deux carbones du citrate en CO_2 et régénérer l'oxaloacétate. Sur un cycle complet, une liaison riche en énergie est produite, sous forme de GTP, qui sert directement à entraîner la synthèse d'une molécule d'ATP ; en outre, il se forme trois molécules de NADH et une molécule de **flavine adénine dinucléotide réduit ($FADH_2$)**, qui est un autre donneur d'électrons dans les réactions d'oxydo-réduction.

Le cycle du citrate achève d'oxyder la molécule de glucose en six molécules de CO_2 ; quatre molécules d'ATP sont produites directement, deux par la glycolyse et deux par le cycle du citrate (une pour chaque molécule de pyruvate). De plus, il se forme dix molécules de NADH (deux venues de la glycolyse, deux de la conversion du pyruvate en acétyl-CoA et six du cycle du citrate) ainsi que deux molécules de $FADH_2$. Le reste de l'énergie tirée de la dégradation du glucose vient de la réoxydation des NADH et $FADH_2$, quand leurs électrons passent sur la chaîne de transport d'électrons pour aboutir finalement à la réduction de O_2 en H_2O.

Au cours de la **phosphorylation oxydative** ou **oxydation phosphorylante**, les électrons de NADH et $FADH_2$ se combinent à O_2 et l'énergie libérée à ce moment est investie dans la synthèse d'ATP à partir d'ADP. Le transfert d'électrons de NADH à O_2 dégage une grande quantité d'énergie libre : $\Delta G^{\circ\prime}$ = -52,5 kcal/mol par paire d'électrons transférés. Cette énergie n'est pas libérée d'un coup, mais graduellement, par le passage des électrons sur une série de transporteurs, formant la **chaîne de transport d'électrons** (figure 2.35), dont les constituants siègent dans la membrane mitochondriale interne des cellules d'eucaryotes (nous reparlerons de l'oxydation phosphorylante en étudiant la mitochondrie, au chapitre 10). Chez les bactéries aérobies, qui possèdent une machinerie comparable, les constituants de la chaîne de transport d'électrons siègent dans la membrane plasmique ; dans chaque cas, le transfert d'électrons de NADH à O_2 fournit une énergie suf-

Figure 2.34
Cycle du citrate. Un groupe dicarboné acétyle est transféré de l'acétyl-CoA à l'oxaloacétate, pour donner du citrate. Deux des carbones du citrate sont alors oxydés en CO_2 et l'oxaloacétate est régénéré. Chaque tour de cycle produit une molécule de GTP, trois de NADH et une de $FADH_2$.

fisante pour produire trois molécules d'ATP. Les électrons de $FADH_2$ ont un pouvoir énergétique moindre et leur passage sur O_2 ne fournit que deux molécules d'ATP au lieu des trois produites à partir de NADH.

Nous pouvons à présent calculer le rendement total en ATP tiré de l'oxydation d'une molécule de glucose : le gain net dans la glycolyse est de deux molécules d'ATP et de deux molécules de NADH ; la conversion de pyruvate en acétylCoA et son catabolisme *via* le cycle du citrate, produisent deux autres molécules d'ATP, huit de NADH et deux de $FADH_2$. En supposant que l'oxydation de chaque molécule de NADH fournit trois molécules d'ATP et celle de $FADH_2$ deux molécules d'ATP, le bilan net est de 38 molécules d'ATP par molécule de glucose. Cependant, le bilan réel est moins favorable dans certaines cellules, car les deux molécules de NADH

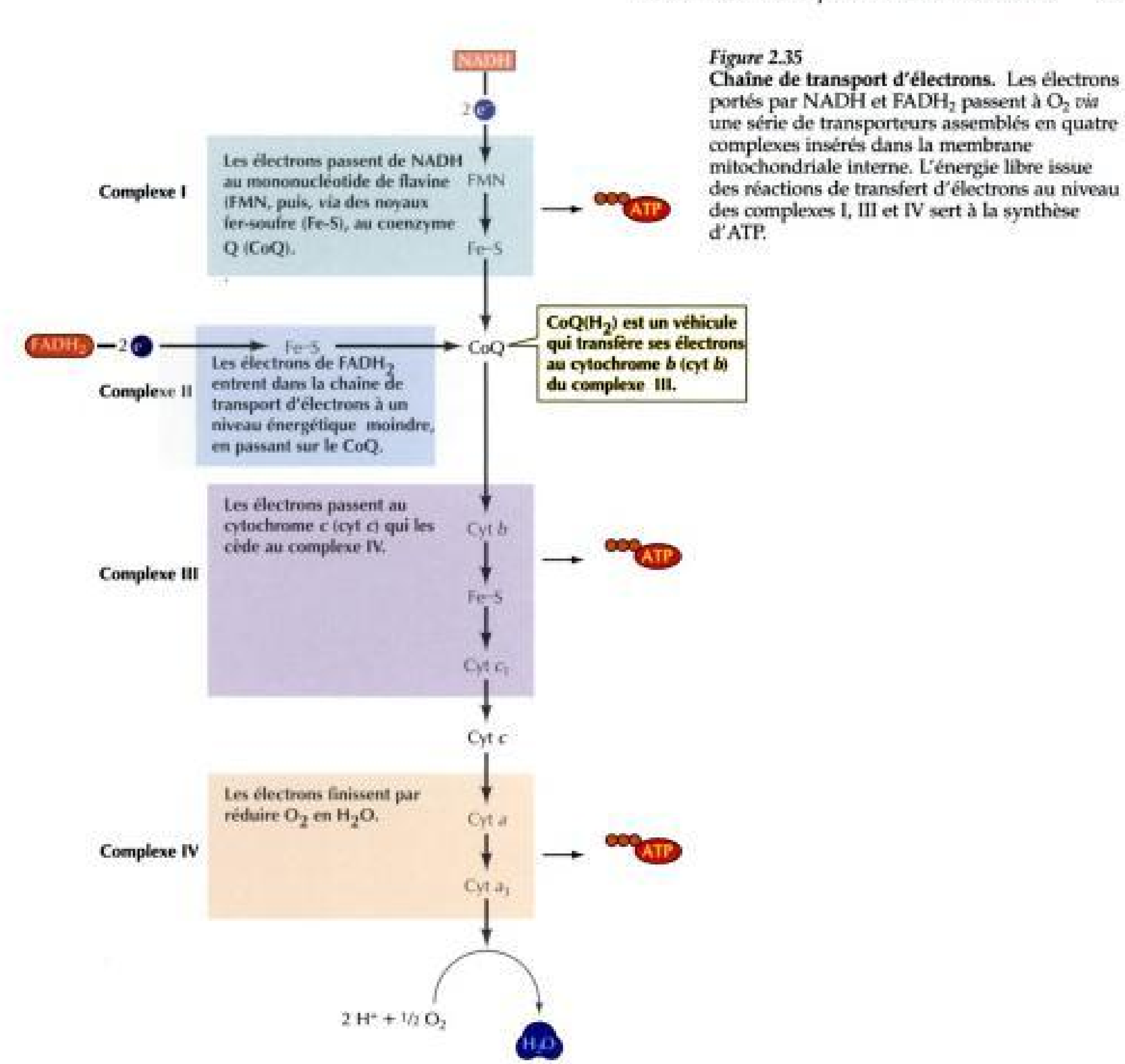


Figure 2.35
Chaîne de transport d'électrons. Les électrons portés par NADH et $FADH_2$ passent à O_2 *via* une série de transporteurs assemblés en quatre complexes insérés dans la membrane mitochondriale interne. L'énergie libre issue des réactions de transfert d'électrons au niveau des complexes I, III et IV sert à la synthèse d'ATP.

issues de la glycolyse dans le cytosol ne pénètrent pas directement dans la mitochondrie ; leurs électrons doivent être pris en charge par un système de navette vers la mitochondrie. Selon le système en fonctionnement, il arrive que ces électrons soient injectés dans la chaîne de transport d'électrons au niveau de $FADH_2$; dans ce cas, les deux molécules de NADH issues de la glycolyse, ne fournissent pas trois, mais deux molécules d'ATP, réduisant le nombre optimal de 38 ATP à 36 ATP par molécule de glucose.

Énergie issue d'autres molécules organiques

L'énergie accumulée sous forme d'ATP provient aussi de la dégradation d'autres molécules organiques, selon les grandes voies métaboliques impliquées dans le catabolisme du glucose. Ainsi, les nucléotides sont réduits à l'état de sucres, injectés dans la glycolyse, et les acides aminés sont dégradés *via* le cycle du citrate. Les deux réservoirs cellulaires principaux d'énergie, à savoir les polysaccharides et les lipides, sont dégradés aussi pour pro-

duire de l'ATP. Les polysaccharides donneront des sucres libres, utilisés comme nous venons de le montrer. Quant aux lipides, ils sont une forme encore bien meilleure de réserve énergétique, car, étant une chaîne en grande partie aliphatique, donc plus réduite que les sucres, leur oxydation fournit plus d'énergie par unité de masse initiale.

Les graisses (triacylglycérols) sont la forme principale de réserve de lipides. La cellule commence par les scinder en glycérol et acides gras. Chaque acide gras sera chargé par le CoA, pour donner un acyl-CoA d'acide gras aux dépens d'une molécule d'ATP (figure 2.36). La chaîne acyle est alors dégradée par un processus oxydant répétitif, de deux carbones à la fois, pour donner de l'acétyl-CoA plus un CoA d'acide gras raccourci d'une unité dicarbonée. Chaque cycle d'oxydation fournit une molécule de NADH et une molécule de $FADH_2$. L'acétyl-CoA entre dans le cycle du citrate et la dégradation du reste de la chaîne continue de la même façon.

Le catabolisme d'une chaîne à 16 carbones fournit donc sept molécules de NADH, sept de $FADH_2$ et huit d'acétyl-CoA. En ATP formés, on compte 21 molécules à partir des NADH (3 x 7), 14 à partir de $FADH_2$ (2 x 7) et 96 à partir de l'acétyl-CoA (8 x 12). Comme une molécule d'ATP a été dépensée pour amorcer la voie, le gain net est de 130 molécules d'ATP par acide gras de 16 carbones. Comparons cette valeur aux 38 molécules d'ATP gagnées par molécule de glucose. Comme la masse moléculaire d'un acide gras saturé à 16 carbones est de 256 et celle du glucose de 180, le rendement en ATP par gramme de substrat est près de 2,5 fois meilleur avec l'acide gras, d'où l'avantage de bâtir ses réserves énergétique avec des graisses plutôt qu'avec des polysaccharides.

Photosynthèse

La génération d'énergie par oxydation des glucides et des lipides dépend de la dégradation de molécules organiques préformées. L'énergie requise pour la synthèse de ces composés provient en fin de compte de la lumière solaire, captée et utilisée pour la synthèse des glucides par les plantes et les bactéries photosynthétiques. En transformant l'énergie des radiations solaires en une forme utilisable d'énergie chimique, la photosynthèse est la source presque unique de l'énergie métabolique des systèmes biologiques.

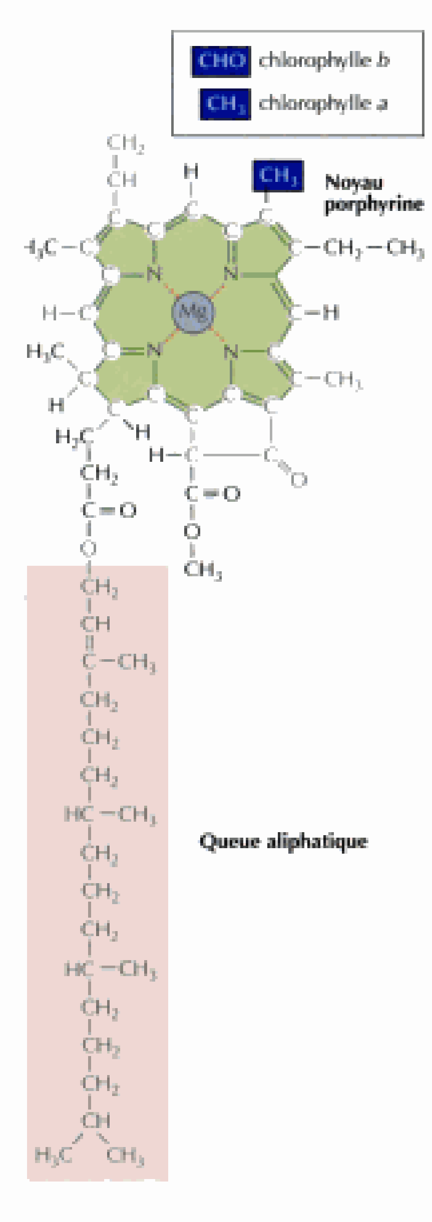
On peut écrire comme suit l'équation globale de la photosynthèse :

$$6\,CO_2 + 6\,H_2O \xrightarrow{\text{Lumière}} C_6H_{12}O_6 + 6\,O_2$$

Le processus est cependant beaucoup plus complexe et s'effectue en deux phases distinctes. Dans la première, appelée **réactions lumineuses**, l'énergie capturée de la lumière solaire entraîne la synthèse d'ATP et de NADPH (un coenzyme semblable au NADH), couplée à l'oxydation de H_2O en O_2. L'ATP et le NADPH formés dans les réactions lumineuses entraînent la synthèse de glucides à partir de CO_2 et de H_2O au cours d'une seconde série de réactions, appelées **réactions obscures** parce qu'elles se passent

Figure 2.36
Oxydation des acides gras. Les chaînes d'acide gras (par exemple, le palmitate, à 16 atomes de carbone) sont d'abord chargées sur le CoA en consommant une molécule d'ATP. L'oxydation de l'acide gras s'effectue par amputation répétitive d'un élément dicarboné sous forme d'acétyl-CoA, couplée à la formation d'une molécule de NADH et d'une de $FADH_2$.

Figure 2.37
Structure d'une chlorophylle. Les chlorophylles comportent un noyau porphyrine lié à une queue aliphatique. La chlorophylle *a* diffère de la chlorophylle *b* par un seul groupe fonctionnel lié à l'anneau porphyrine.



même en l'absence de lumière. Dans les cellules d'eucaryotes, c'est dans le chloroplaste que s'effectuent tant les réactions lumineuses que les réactions obscures.

Les **pigments photosynthétiques** capturent l'énergie du soleil en absorbant des photons ; ceux-ci expulsent un électron de son orbitale moléculaire normale vers une orbitale d'énergie supérieure, ce qui revient à transformer une énergie solaire en énergie chimique. Chez les plantes, le pigment photosynthétique prépondérant est l'ensemble des **chlorophylles** (figure 2.37), qui absorbent toutes les longueurs d'onde de la lumière visible, sauf le vert. D'autres pigments absorbent la lumière visible à d'autres longueurs d'onde, de sorte que pratiquement tout le spectre de la lumière visible est capté et utilisé dans la photosynthèse.

L'énergie captée par l'absorption des photons sert à transformer H_2O en O_2 (figure 2.38). Les électrons d'énergie élevée obtenus par ce processus gagnent alors la chaîne de transport d'électrons, où leur passage sur une série de transporteurs est couplé à la synthèse d'ATP ; en outre, ces électrons réduisent $NADP^+$ en NADPH.

Dans les réactions sombres, l'ATP et le NADPH formés par les réactions lumineuses entraînent la synthèse de glucides à partir de CO_2 et H_2O. Une molécule de CO_2 à la fois est introduite dans un cycle de réactions, connu sous le nom de **cycle de Calvin** (d'après Melvin Calvin qui l'a découvert) pour aboutir à la formation de glucides (figure 2.39). Ce cycle consomme globalement 18 molécules d'ATP et 12 de NADPH par molécule de glucose formée. Deux électrons étant nécessaires pour transformer chaque molécule de $NADP^+$ en NADPH, 24 électrons doivent donc parcourir la chaîne de transport d'électrons pour produire la quantité de NADPH investie dans la formation d'une molécule de glucose. Ces électrons proviennent de la conversion de 12 molécules de H_2O en six molécules de O_2, ce qui concorde avec la formation de 6 molécules de O_2 par molécule de glucose. On ignore cependant si le passage de ces 24 électrons eux-mêmes à travers la chaîne de transport suffit à générer les 18 ATP consommés dans le cycle de Calvin. Certains de ces ATP pourraient provenir d'une autre chaîne de transport d'électrons mue par l'énergie solaire, mais qui n'effectuerait pas de synthèse de NADPH (voir chapitre 10).

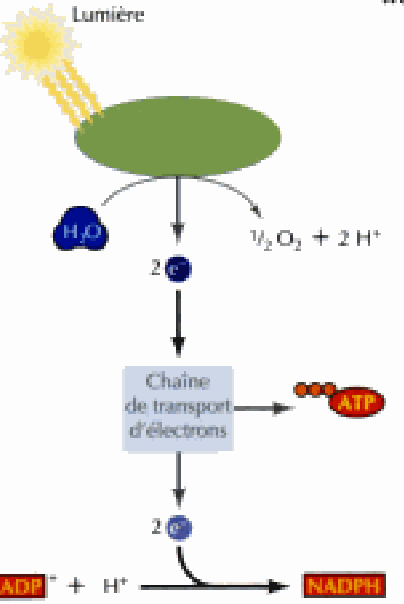


Figure 2.38
Réactions lumineuses de la photosynthèse. L'énergie solaire sert à extraire O_2 de H_2O. Les électrons de haute énergie issus de ce processus passent ensuite sur une série de transporteurs et vont réduire $NADP^+$ en NADPH. L'énergie produite par ces réactions de transport d'électrons sert aussi à la synthèse d'ATP. Voir le chapitre 10 pour les détails.

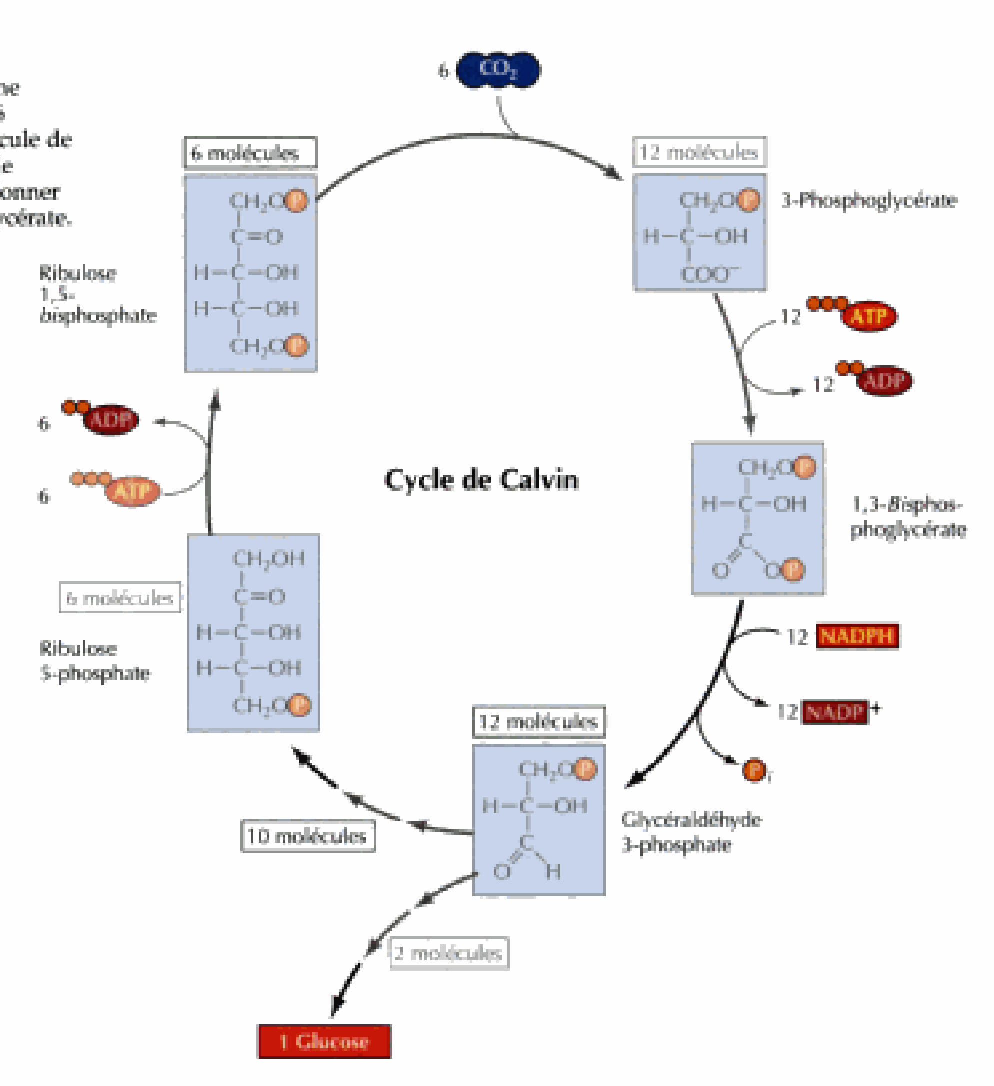


Figure 2.39
Cycle de Calvin. Synthèse d'une molécule de glucose à partir de 6 molécules de CO_2. Chaque molécule de CO_2 est greffée à une molécule de ribulose 1,5-*bis*phosphate pour donner deux molécules de 3-phosphoglycérate. Six molécules de CO_2 aboutissent donc à la formation de 12 molécules de 3-phosphoglycérate, qui se transforment en 12 molécules de glycéraldéhyde 3-phosphate aux dépens de 12 molécules de NADPH et de 12 molécules d'ATP. Deux molécules de glycéraldéhyde 3-phosphate servent alors à former une molécule de glucose pendant que les 10 autres empruntent le cycle de Calvin pour former six molécules de ribulose 5-phosphate. Le cycle s'achève par la consommation des six molécules supplémentaires d'ATP requises pour former le ribulose 1,5-*bis*phosphate.

BIOSYNTHÈSE DES CONSTITUANTS CELLULAIRES

Nous venons de parcourir les diverses réactions métaboliques qui permettent à la cellule de récupérer de l'énergie et de la mettre en réserve sous forme d'ATP. Cette énergie sert à entraîner divers processus, notamment la synthèse des macromolécules et d'autres constituants cellulaires. L'énergie obtenue de la dégradation de constituants organiques (catabolisme) est réinvestie dans la synthèse d'autres composants indispensables à la cellule. Les voies cataboliques impliquent pour la plupart une oxydation de molécules organiques couplée à la production d'énergie (ATP) et de pouvoir réducteur (NADH) ; par contre, pour assembler de nouveaux constituants organiques, les voies biosynthétiques (anabolisme) consomment d'habitude l'énergie (ATP) et la capacité réductrice (en général sous forme de NADPH) pour constituer de nouveaux composés organiques. Dans la section précédante, nous avons décrit un des principaux chemins de biosynthèse, la synthèse des glucides à partir de CO_2 et H_2O pendant la phase obscure de la photosynthèse. Voici d'autres voies de biosynthèse des principaux constituants cellulaires (glucides, lipides, protéines et acides nucléiques).

Glucides

Si la cellule obtient du glucose directement de ses aliments et de la photosynthèse, elle en synthétise parfois à partir d'autres molécules organiques.

Chez les animaux, la synthèse de glucose (**gluconéogenèse**) part en général de lactate (produit par la glycolyse anaérobie), d'acides aminés (issus de la dégradation de protéines) ou du glycérol (un produit de la dégradation des lipides). Les plantes (pas les animaux) peuvent aussi synthétiser du glucose à partir d'acides gras, une voie particulièrement cruciale lors de la germination des graines, puisque l'énergie accumulée sous forme de lipides y sera convertie en glucides nécessaires au développement de l'embryon. Tant chez l'animal que chez la plante, les sucres simples sont polymérisés et mis en réserve sous forme de polysaccharides.

La gluconéogenèse consiste en la conversion de pyruvate en glucose, une sorte de glycolyse à rebours, sauf que, nous l'avons indiqué, la conversion de glucose en pyruvate libère de l'énergie, à savoir deux molécules d'ATP et deux de NADH. Si certaines réactions de la voie glycolytique sont facilement réversibles, d'autres ne fonctionnent que dans le sens d'une dégradation de glucose, parce qu'elles s'accompagnent d'une importante décroissance d'énergie libre. Ces réactions particulièrement favorisées au point de vue énergétique dans la glycolyse sont remplacées, dans la gluconéogenèse, par d'autres réactions (*via* d'autres enzymes) qui, couplées à l'utilisation d'ATP et de NADH, sont entraînées dans le sens de la gluconéogenèse. La formation de glucose à partir de deux molécules de pyruvate exige en tout quatre molécules d'ATP, deux de GTP et deux de NADH ; c'est donc une voie plus coûteuse qu'un simple renversement de la glycolyse (qui engloutirait deux molécules d'ATP et deux de NADH), témoignant du fait qu'une voie biosynthétique ne fonctionne qu'aux dépens d'un supplément d'énergie.

Chez les animaux et les plantes, le glucose est mis en réserve sous forme de polysaccharides (glycogène et amidon, respectivement). Comme celle d'autres macromolécules, la synthèse de polysaccharides consomme de l'énergie ; on a vu que l'union de deux sucres par une liaison glycosidique équivaut à une déshydratation (voir figure 2.3). Ce type de réaction est défavorisé au point de vue énergétique : la liaison glycosidique ne se forme que si elle est couplée à une réaction libérant de l'énergie. C'est le rôle des nucléotides de sucres, les intermédiaires dans la synthèse des polysaccharides (figure 2.40). Dans une réaction consommant de l'ATP, le glucose est d'abord phosphorylé en glucose 6-phosphate, converti ensuite en glucose 1-phosphate ; celui-ci réagit avec l'UTP (uridine triphosphate), pour donner de l'UDP-glucose et du pyrophosphate, hydrolysé en phosphate avec perte d'énergie supplémentaire. L'UDP-glucose est un intermédiaire activé de glucose qui transfère son groupe glycosyle à une chaîne polysaccharidique en croissance, au cours d'une réaction énergétiquement favorisée. C'est donc l'énergie chimique de l'ATP et de l'UTP qui entraîne la synthèse de polysaccharides à partir des sucres.

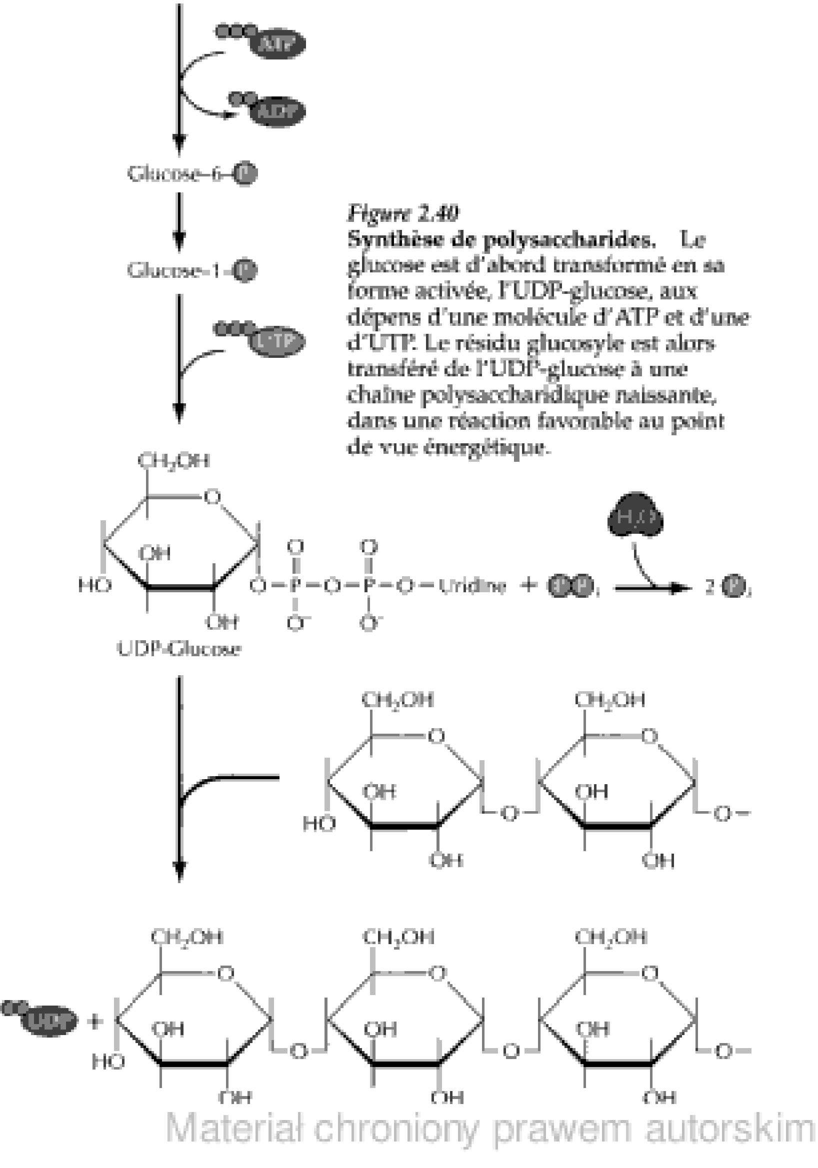
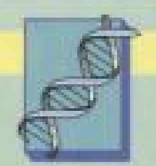


Figure 2.40
Synthèse de polysaccharides. Le glucose est d'abord transformé en sa forme activée, l'UDP-glucose, aux dépens d'une molécule d'ATP et d'une d'UTP. Le résidu glucosyle est alors transféré de l'UDP-glucose à une chaîne polysaccharidique naissante, dans une réaction favorable au point de vue énergétique.

MÉDECINE MOLÉCULAIRE



Phenylcétonurie

Pathogénie

La phénylcétonurie (PKU, en anglais) est une erreur congénitale du métabolisme d'un acide aminé qui menace gravement la santé. Elle frappe près d'un nouveau-né sur 10 000 et, laissée sans soin, elle aboutit à un retard mental profond. Heureusement, depuis qu'on connaît la nature du déficit responsable de la phénylcétonurie, on sait la diagnostiquer et la traiter dès les premiers jours de la vie.

Bases moléculaire et cellulaire

La phénylcétonurie est due à un déficit de phénylalanine hydroxylase, l'enzyme qui transforme la phénylalanine en tyrosine ; de ce fait, la phénylalanine atteint un taux très élevé dans la cellule et entre dans d'autres voies métaboliques, pour donner, notamment, du phénylpyruvate. Phénylalanine, phénylpyruvate et autres métabolites anormaux s'accumulent dans le sang et sont sécrétés en grande quantité dans l'urine (le nom de la maladie vient du phénylpyruvate, une phénylcétone qui atteint un taux très élevé dans l'urine des enfants touchés). Ceci conduit à un retard mental important, dont le processus biochimique reste inconnu.

Prévention et traitement

Le déficit en enzyme est latent pendant la grossesse et l'enfant naît tout à fait normal, mais sans traitement, il va subir un retard mental sévère et irréversible au cours de la première année. On peut heureusement détecter la phénylcétonurie à la naissance, par un test de routine, qui décèle les taux anormalement élevés de phénylalanine. On empêche l'apparition du retard mental en mettant le nouveau-né sous alimentation artificielle pauvre en phénylalanine. Ce régime prévient l'accumulation des métabolites toxiques de la phénylalanine, ainsi que l'apparition du retard mental irréversible tant redouté. Le test de routine auquel sont soumis tous les nouveau-nés est donc un geste impératif.

Phénylalanine hydroxylase

Phénylalanine → Tyrosine

Phénylalanine → Phénylpyruvate (une phénylcétone)

Métabolisme aberrant de la phénylalanine chez les patients atteints de phénylcétonurie

Lipides

Les molécules de lipides constituent d'importantes réserves énergétiques et les constituants prépondérants des membranes. Leur synthèse part de l'acétyl-CoA issu de la dégradation des glucides et passe par une série de réactions qui ressemble à un renversement de l'oxydation des lipides, mais, comme dans la gluconéogenèse, les réactions de biosynthèse des acides gras diffèrent de celles menant à leur dégradation en ceci qu'elles sont couplées à une consommation d'énergie puisée dans l'ATP ainsi que dans le pouvoir réducteur du NADPH. Ces acides gras sont synthétisés par addition répétitive d'éléments dicarbonés, dérivés de l'acétyl-CoA, à une chaîne en croissance, chaque addition consommant une molécule d'ATP et deux molécules de NADPH.

Le produit principal de la biosynthèse des acides gras, présent dans le cytosol des cellules d'eucaryotes, est un acide gras à 16 carbones, le palmitate. Les composants majeurs des membranes cellulaires (phospholipides, sphingomyélines et glycolipides) sont synthétisés à partir d'acides gras dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi (voir chapitre 9).

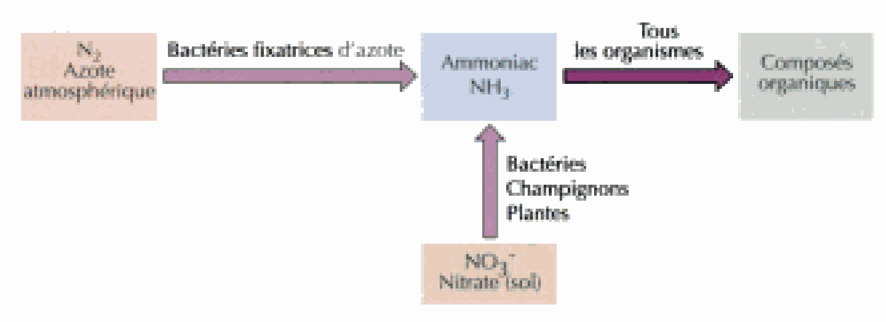


Figure 2.41
Assimilation d'azote dans des composés organiques. L'ammoniac est incorporé aux molécules organiques par tous les organismes. Certaines bactéries sont capables de transformer l'azote atmosphérique en ammoniac ; la plupart des bactéries, des champignons et des plantes utilisent le nitrate du sol pour obtenir leur ammoniac.

Protéines

En plus du carbone, de l'hydrogène et de l'oxygène composant les glucides et les lipides, les protéines (comme les acides nucléiques) contiennent aussi de l'azote. L'azote qui s'incorpore aux composés organiques provient de diverses sources, selon l'organisme considéré (figure 2.41). Il est des bactéries qui le puisent dans l'air et l'assimilent par un processus appelé **fixation d'azote**, qui consiste dans la réduction de N_2 en NH_3 aux dépens de l'énergie fournie par l'ATP ; peu d'espèces bactériennes peuvent fixer ainsi l'azote ; la plupart des bactéries, des champignons et des plantes utilisent le nitrate (NO_3^-), un constituant courant du sol, en le réduisant en NH_3 grâce à des électrons donnés par NADH et NADPH. L'ammoniac, tous les organismes sont capables de l'incorporer dans leurs constituants azotés.

L'ammoniac s'incorpore aux molécules organiques notamment lors de la synthèse de certains acides aminés, comme le glutamate et la glutamine, dérivés d'un intermédiaire du cycle du citrate, l'α-cétoglutarate ; ces deux acides aminés sont ensuite des donneurs de groupes aminés lors de la synthèse des autres acides aminés, fournis aussi par les voies métaboliques centrales, comme la glycolyse et le cycle du citrate (figure 2.42). Le matériau brut entrant dans la synthèse des acides aminés vient donc du glucose et les acides aminés sont synthétisés aux dépens d'énergie (ATP) et de pouvoir réducteur (NADPH). Beaucoup de bactéries et de plantes synthétisent tous les 20 acides aminés, mais l'Homme et les mammifères ne peuvent pas en synthétiser plus de la moitié ; les autres, absolument indispensables, ils les reçoivent de l'alimentation (tableau 2.2).

La polymérisation des acides aminés en protéines requiert aussi de l'énergie. Comme dans la formation de la liaison glycosidique des polysaccharides, la formation de la liaison peptidique revient à une réaction de déshydratation, qui, pour prendre le sens d'une synthèse de protéine, doit être couplée à une source d'énergie métabolique. Lors de la synthèse d'un polysaccharide, ce couplage se fait par conversion du sucre en intermédiaire activé, comme l'UDP-glucose, par exemple. De même, les acides aminés sont activés avant d'entrer dans une chaîne polypeptidique.

Une différence radicale entre la synthèse d'une protéine et celle d'un polysaccharide est que les acides aminés s'incorporent à la protéine selon un ordre singulier, fixé par le gène ; l'ordre des nucléotides du gène spécifie celui des acides aminés (la séquence) de la protéine au moment de la traduction, processus au cours

Figure 2.42
Biosynthèse d'acides aminés. Le squelette carboné des acides aminés provient d'intermédiaires de la glycolyse et du cycle du citrate.

Tableau 2.2 Acides aminés indispensables à l'Homme

Essentiels	Non essentiels
Histidine	Alanine
Isoleucine	Arginine*
Leucine	Asparagine
Lysine	Aspartate
Méthionine	Cystéine
Phénylalanine	Glutamate
Thréonine	Glutamine
Tryptophane	Glycine
Valine	Proline
	Sérine
	Tyrosine

Les acides aminés essentiels viennent de l'alimentation ; les autres sont synthétisés par les cellules humaines.

*Bien que l'arginine ne soit pas classée comme essentielle, les enfants en période de croissance doivent en trouver un supplément dans leurs aliments.

duquel l'ARN messager (ARNm) sert de matrice à la polymérisation de la chaîne protéique (voir chapitre 3). Chaque acide aminé est d'abord greffé à une molécule particulière d'ARN de transfert (ARNt) dans une réaction consommant un ATP (figure 2.43). L'aminoacyl-ARNt va alors s'aligner sur l'ARNm matrice fixé aux ribosomes et chaque acide aminé se greffe au bout carboxyle d'une chaîne naissante grâce à une série de réactions que nous étudierons au chapitre 7. Deux autres molécules de GTP étant consommées dans ce processus, l'incorporation de chaque acide aminé dans la chaîne protéique est couplée à la scission d'un ATP et de deux GTP.

Acides nucléiques

Les nucléotides, éléments modulaires des acides nucléiques, se composent de sucres pentacarbonés phosphorylés unis à une base d'acide nucléique. La cellule synthétise ses nucléotides à partir de sucres et d'acides aminés, sinon elle les trouve dans l'alimentation ou les recycle avant qu'ils ne soient dégradés. Le point de départ de la synthèse de nucléotides est un sucre

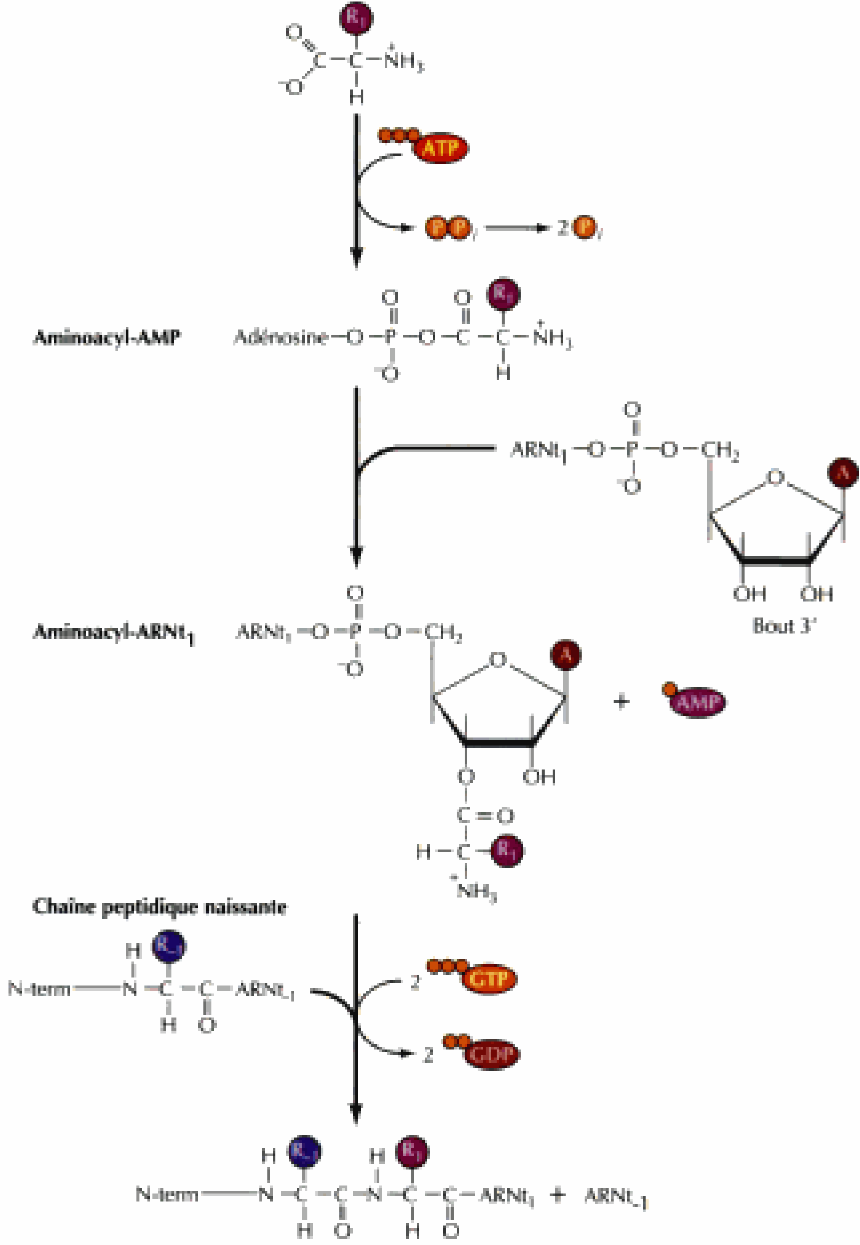


Figure 2.43
Formation de la liaison peptidique. L'acide aminé est d'abord activé par attachement à son ARNt, *via* une réaction en deux étapes impliquant la rupture d'un ATP en ADP et l'hydrolyse de ce dernier en AMP. L'ARNt sert d'adaptateur pour aligner chaque acide aminé sur la matrice d'ARNm liée aux ribosomes. Chaque acide aminé est ensuite greffé au C-terminal de la chaîne peptidique naissante au prix, supplémentaire, de deux molécules de GTP.

Figure 2.44
Synthèse d'un polynucléotide. Le triphosphate de nucléoside est greffé au bout 3' d'une chaîne polynucléotidique naissante, avec départ de pyrophosphate.

phosphorylé, le ribose 5-phosphate, dérivé du glucose 6-phosphate. Des voies distinctes mènent ensuite aux ribonucléotides de purine et de pyrimidine, précurseurs directs de la synthèse des ARN. Ces ribonucléotides se transforment ensuite en désoxyribonucléotides, les éléments de construction de l'ADN.

ARN et ADN sont des polymères de monophosphates de nucléoside. Comme pour les autres macromolécules, la polymérisation directe de monophosphates de nucléoside est nettement défavorisée au point de vue énergétique ; aussi, la synthèse de polynucléotides doit-elle puiser dans les triphosphates de nucléosides comme précurseurs activés (figure 2.44). Chaque triphosphate-5' de nucléoside va se greffer sur le groupe hydroxyle 3' de la chaîne polynucléotidique naissante, avec départ et hydrolyse de pyrophosphate, une réaction qui pousse dans le sens de la synthèse du polymère.

MEMBRANES CELLULAIRES

La cellule doit impérativement sa structure et ses fonctions à ses membranes, qui non seulement séparent le cytoplasme de l'environnement, mais délimitent les compartiments intérieurs des cellules d'eucaryotes, notamment leur noyau et leurs organites cytoplasmiques. La formation des membranes biologiques repose sur les propriétés des lipides et les membranes ont toutes une même infrastructure : une bicouche lipidique emprisonnant des protéines. Ces protéines membranaires participent à de nombreuses fonctions ; certaines servent de récepteur à la cellule pour capter des signaux extérieurs, certaines transportent sélectivement des molécules

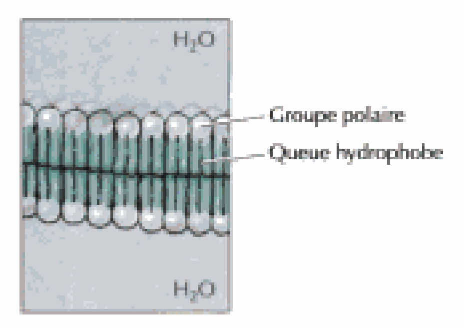


Figure 2.45
Bicouche phospholipidique. Les phospholipides forment spontanément des bicouches stables ; leur groupe polaire est au contact de l'eau, leurs queues hydrophobes sont immergées dans le sein de la membrane.

à travers la membrane, d'autres prennent part au transport d'électrons et à l'oxydation phosphorylante. En outre, plusieurs protéines membranaires commandent les interactions entre cellules chez les organismes pluricellulaires. L'infrastructure commune à toutes les membranes soutient une variété de processus biologiques et de fonctions membranaires spécialisées, que nous décrirons dans les autres chapitres.

Lipides membranaires

Les éléments primordiaux de toute membrane cellulaire sont les phospholipides, des molécules amphipathiques formées de deux chaînes hydrophobes d'acides gras liées à un groupe polaire hydrophile phosphorylé (voir figure 2.7). Comme leurs chaînes d'acide gras sont très peu solubles dans l'eau, les phospholipides forment spontanément des bicouches dans les solutions aqueuses, leurs têtes hydrophobes tournées vers le cœur de la membrane, leur groupe polaire exposé sur l'une ou l'autre face, au contact de l'eau (figure 2.45). Ces **bicouches phospholipidiques** constituent une barrière stable entre deux compartiments aqueux et sont la trame fondamentale de toutes les membranes biologiques.

Les lipides constituent près de la moitié de la masse de la plupart des membranes cellulaires, bien que cette proportion varie selon le type de membrane. Ainsi, les membranes plasmiques comptent à peu près 50 % de lipides et 50 % de protéines (en poids) ; par contre, la membrane mitochondriale interne contient une proportion exceptionnellement grande (75 %) de protéines, témoin du taux élevé de complexes protéiques en jeu dans le transfert d'électrons et l'oxydation phosphorylante. La composition d'une membrane en phospholipides varie aussi selon l'origine de la membrane (tableau 2.3) ; la membrane plasmique de *E. coli* comprend jusqu'à 80 % de phosphatidyléthanolamine ; celle des cellules de mammifères, plus complexe, est faite de quatre phospholipides principaux, les phosphatidylcholine, phosphatidylsérine, phosphatidyléthanolamine et sphingomyéline, comptant en tout pour 50 à 60 % de la masse totale des lipides membranaires. Outre ces phospholipides, la membrane plasmique des cellules animales contient des glycolipides et du cholestérol, qui représentent en général près de 40 % de toutes les molécules de lipides.

Un trait important des bicouches lipidiques est le fait qu'elles se comportent comme un fluide bidimensionnel dans lequel chaque molécule (lipide ou protéine) est libre de tourner sur elle-même et de glisser dans le plan de la bicouche (figure 2.46). Cette fluidité est cruciale pour une membrane et dépend de sa composition en lipides et de la température ; l'interaction entre les chaînes d'acides gras les plus courtes, par exemple, est moindre qu'entre les chaînes longues, de sorte que les membranes contenant ces chaînes courtes sont moins rigides et restent fluides à des tempé-

Tableau 2.3 Composants lipidiques des membranes cellulaires

Lipide	Membrane plasmique *E. coli*	Membrane plasmique Érythrocyte	Réticulum endoplasmique rugueux	Membrane mitochondriale externe
Phosphatidylcholine	0	17	55	50
Phosphatidylsérine	0	6	3	2
Phosphatidyl-éthanolamine	80	16	16	23
Sphingomyéline	0	17	3	5
Glycolipides	0	2	0	0
Cholestérol	0	45	6	<5

D'après P. L. Yeagle, *The Membranes of Cells*, 2nd ed. (1993) Academic Press, San Diego, CA. Composition en moles pour cent moles des principaux constituants.

ratures plus basses. Les lipides composés de chaînes d'acides gras insaturés accroissent aussi la fluidité membranaire, parce que les liaisons doubles, en incurvant certaines chaînes, les empêchent de se compacter parfaitement.

À cause de la forme cyclique de son noyau hydrocarboné (voir figure 2.9), le cholestérol exerce un rôle particulier sur la fluidité membranaire. La molécule de cholestérol s'insère dans la bicouche avec le groupe hydroxyle de sa tête polaire placé à la hauteur des groupes hydrophiles polaires des phospholipides (figure 2.47) ; le noyau hydrocarboné rigide du cholestérol est donc au contact de la partie des chaînes d'acides gras qui est voisine de la tête polaire des phospholipides ; cette interaction rend cette région externe des chaînes d'acide gras moins mobile, donc cette partie de la membrane plus rigide. D'autre part, l'insertion de cholestérol interfère avec les interactions entre chaînes d'acides gras et maintient ainsi la fluidité membranaire aux températures plus basses.

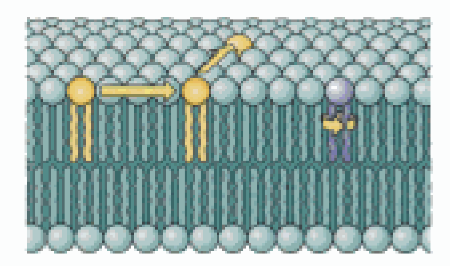


Figure 2.46
Mobilité des phospholipides membranaires. Chaque phospholipide peut tourner sur lui-même et glisser dans le plan de la membrane.

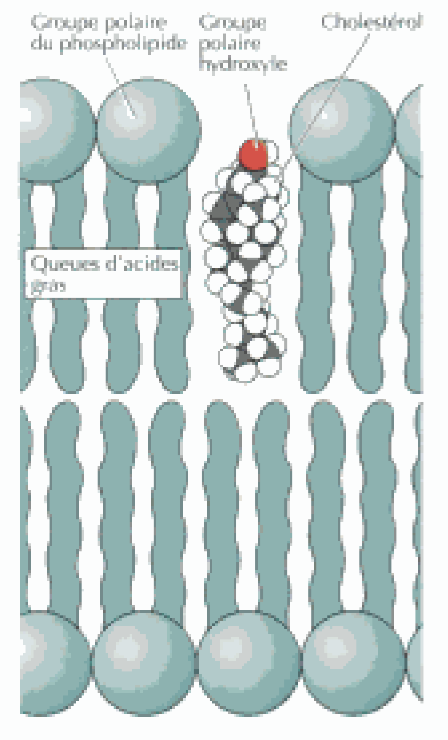
Protéines membranaires

Les autres composants majeurs d'une membrane sont les protéines ; elles constituent de 25 à 75 % de la masse des diverses membranes d'une cellule. Le modèle de structure membranaire, proposé par Jonathan Singer et Garth Nicolson en 1972 et devenu classique, est une **mosaïque fluide** dans laquelle les protéines sont noyées au sein d'une bicouche lipidique (figure 2.48) ; les phospholipides en sont l'infrastructure fondamentale, les protéines membranaires y remplissent le rôle particulier attribué dans la cellule à chaque espèce de membrane. On classe ces protéines en deux catégories, selon la nature de leur association avec la bicouche : les **protéines membranaires intrinsèques** sont enfouies directement au sein de la bicouche, les **protéines membranaires adventices** ne sont pas noyées dans la bicouche lipidique, mais sont arrimées indirectement à la membrane par des interactions avec les protéines intrinsèques.

Beaucoup de protéines membranaires intrinsèques (les **protéines transmembranaires**) traversent la membrane de part en part, en émergeant à chaque face de la membrane. La partie transmembranaire de ces protéines est formée habituellement de séquences de 20 à 25 acides aminés hydrophobes disposés en hélice α ; leurs chaînes latérales hydrophobes entrent en interaction avec les chaînes d'acides gras des lipides membranaires et la formation d'hélices α neutralise le caractère polaire des liaisons peptidiques, comme on l'a indiqué au début de ce chapitre à propos du reploiement des chaînes polypeptidiques. Les protéines transmembranaires sont, comme les phospholipides, des molécules amphipathiques, pôle hydrophile tourné vers le milieu aqueux baignant chaque face de la membrane. Certaines protéines transmembranaires ne traversent la membrane qu'une fois, la chaîne polypeptidique de certaines autres la traverse plusieurs fois. La plupart des protéines transmembranaires des membranes plasmiques d'eucaryotes ont été modifiées par greffe de glucides, qui, exposés à la surface de la cellule, sont prêts à former des interactions entre cellules.

On connaît des protéines arrimées aux membranes par des lipides liés par covalence à la chaîne polypeptidique (voir chapitre 7). Des modifications singulières de lipides ancrent telle protéine à la face cytosolique d'une membrane, telle autre à sa face extracytoplasmique ; une protéine est ancrée à la face cytosolique d'une membrane par greffage d'un acide gras à 14 carbones (le myristate) à son bout aminé, ou par transfert d'un acide gras à 16 carbones (le palmitate) ou d'un groupe prényle à 15 ou 20 carbones sur la chaîne latérale d'un résidu cystéine. À la face extracellulaire de la membrane plasmique, on trouve des protéines arrimées par des glycolipides qui ont été greffés au bout carboxyle de la chaîne protéique.

Figure 2.47
Insertion de cholestérol dans une membrane. Le cholestérol s'implante dans une membrane avec son groupe hydroxyle polaire au voisinage des groupes polaires des phospholipides.



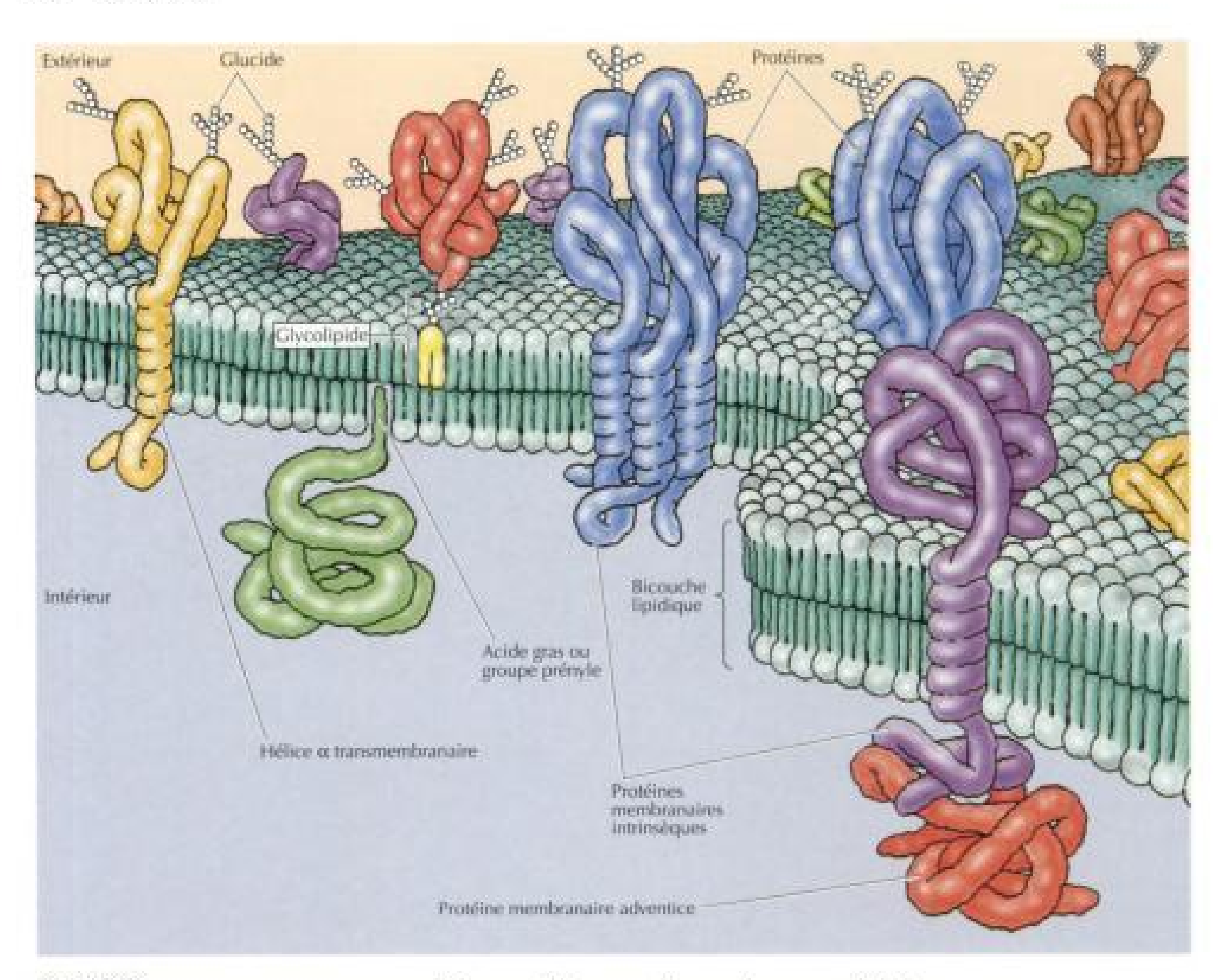


Figure 2.48
Modèle de la mosaïque fluide illustrant la structure membranaire. Les membranes biologiques sont des bicouches phospholipidiques chargées de protéines. Les protéines membranaires intrinsèques y sont noyées, d'habitude par des régions de 20 à 25 résidus hydrophobes disposés en hélice α. Certaines protéines transmembranaires ne traversent la membrane qu'une fois, d'autres ont plusieurs tronçons transmembranaires. De plus, certaines protéines sont ancrées à la membrane par l'intermédiaire de lipides attachés par covalence à la chaîne polypeptidique. Ces protéines sont fixées à la face extracytoplasmique de la membrane par un glycolipide, ou à sa face cytosolique par un acide gras ou un groupe prényle (voir leur structure au chapitre 7). Les protéines membranaires adventices ne sont pas implantées dans la membrane, mais tenues par interaction avec des protéines membranaires intrinsèques.

Transport à travers les membranes cellulaires

La perméabilité sélective des membranes biologiques aux petites molécules fait que la cellule peut ajuster et maintenir sa composition interne. Seules quelques petites espèces moléculaires peuvent diffuser librement à travers les bicouches phospholipidiques (figure 2.49) ; certaines molécules non polaires, comme O_2 et CO_2, sont solubles dans la bicouche lipidique et passent rapidement d'une face à l'autre de la membrane ; certaines molécules polaires non chargées, si elles sont petites, comme H_2O, diffusent aussi à travers les membranes, mais de plus grandes, comme le glucose, sont arrêtées par les membranes. Les molécules chargées, notamment les ions, ne passent jamais une membrane, quelle que soit leur taille, puisque même H^+ ne franchit pas une bicouche lipidique par diffusion.

Si les ions et la plupart des molécules polaires ne diffusent pas à travers une bicouche lipidique, bon nombre d'entre elles cependant, comme le glucose, sont capables de traverser les membranes grâce à des protéines intrinsèques particulières appelées transporteurs. Ceux-ci fixent la sélectivité de chaque type de membrane et jouent un rôle clé dans le fonctionnement d'une membrane. Ces transporteurs se composent de plusieurs régions transmembranaires, qui ménagent un tunnel au sein de la bicouche lipidique, tunnel par où les molécules polaires ou chargées franchissent la membrane sans entrer au contact des chaînes d'acide gras hydrophobes des phospholipides membranaires.

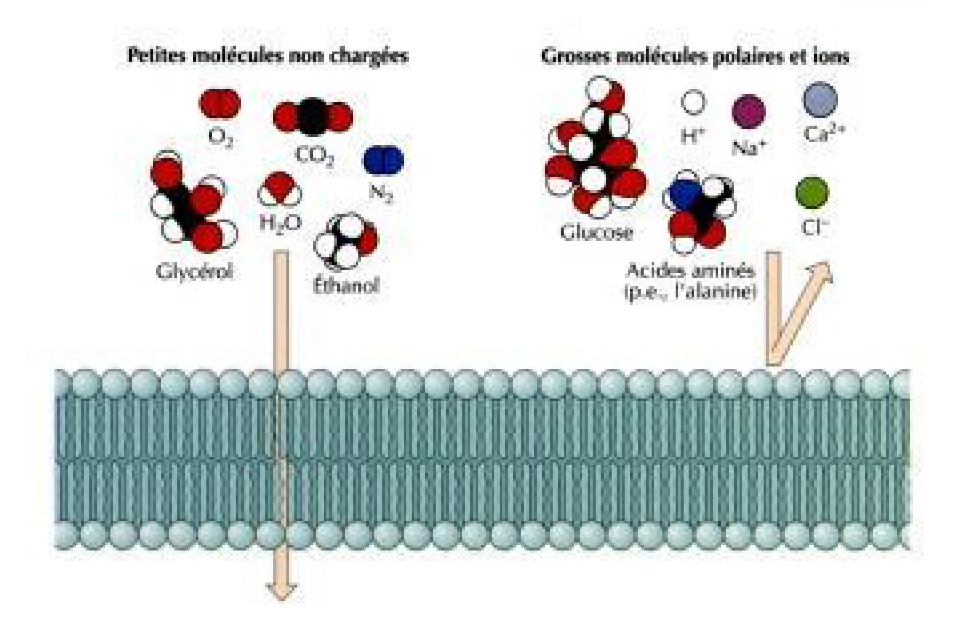
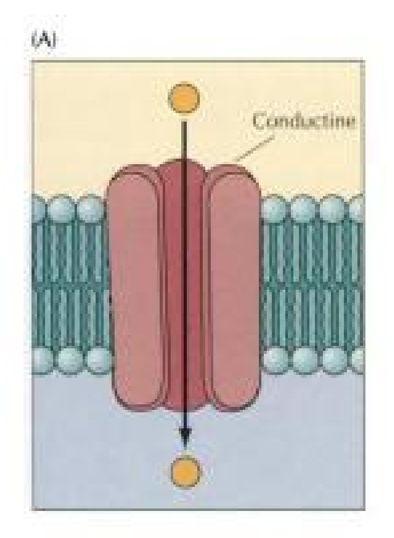


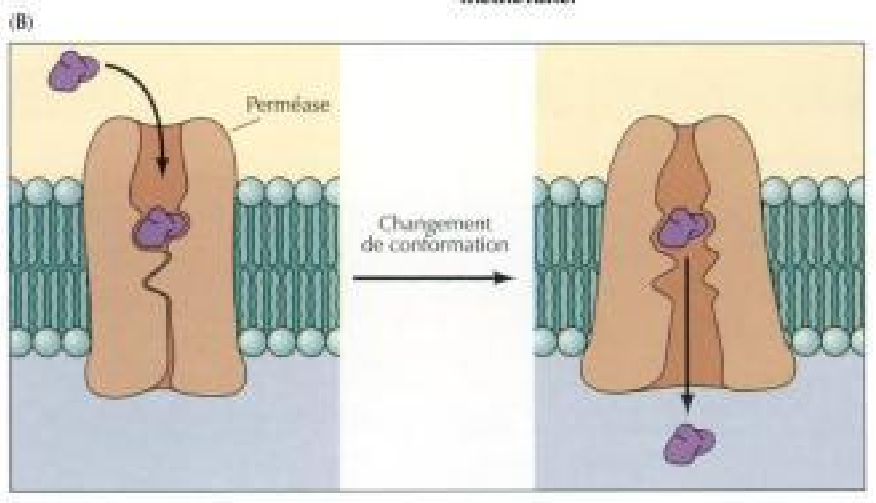
Figure 2.49
Perméabilité d'une bicouche phospholipidique. Les petites molécules non chargées diffusent librement à travers une bicouche phospholipidique, mais celle-ci est imperméable aux acides aminés, aux ions et aux grosses molécules polaires, comme le glucose.

Comme on le verra au chapitre 12, il existe deux grandes classes de transporteurs membranaires (figure 2.50). La première est celle des **conducteurs protéiques** ou **conductines** qui forment des pores ouverts à travers la membrane pour livrer passage à toute molécule de taille convenable ; les conductines à ions, par exemple, sont perméables aux ions minéraux comme Na^+, K^+, Ca^{2+} et Cl^-. Une fois ouverts, ces conducteurs protéiques forment de petits pores que les ions de taille appropriée traversent par diffusion, mais ces pores ne restent pas toujours ouverts, ils s'ouvrent et se ferment sélectivement, en réponse à des signaux extracellulaires, de sorte que la cellule peut ajuster le déplacement des ions à travers sa membrane. On a particulièrement bien étudié ces tunnels à ions dans les cellules musculaires et nerveuses, là où ils servent à transmettre les signaux électrochimiques.

La deuxième classe de protéines tranporteuses comprend les **perméases protéiques**, qui fixent sélectivement et transportent de petites molécules, comme le glucose ; au lieu de former des pores ouverts, ces protéines porteuses agissent à la façon d'enzymes pour faciliter le passage de petites molécules à travers une membrane. En fait, elles capturent un type de molé-

Figure 2.50
Conductines et perméases.
(A) Les conductines forment des pores laissant passer les molécules de taille appropriée (par exemple, les ions). (B) Les perméases fixent sélectivement de petites molécules, puis subissent un changement de conformation qui décharge la molécule de l'autre côté de la membrane.





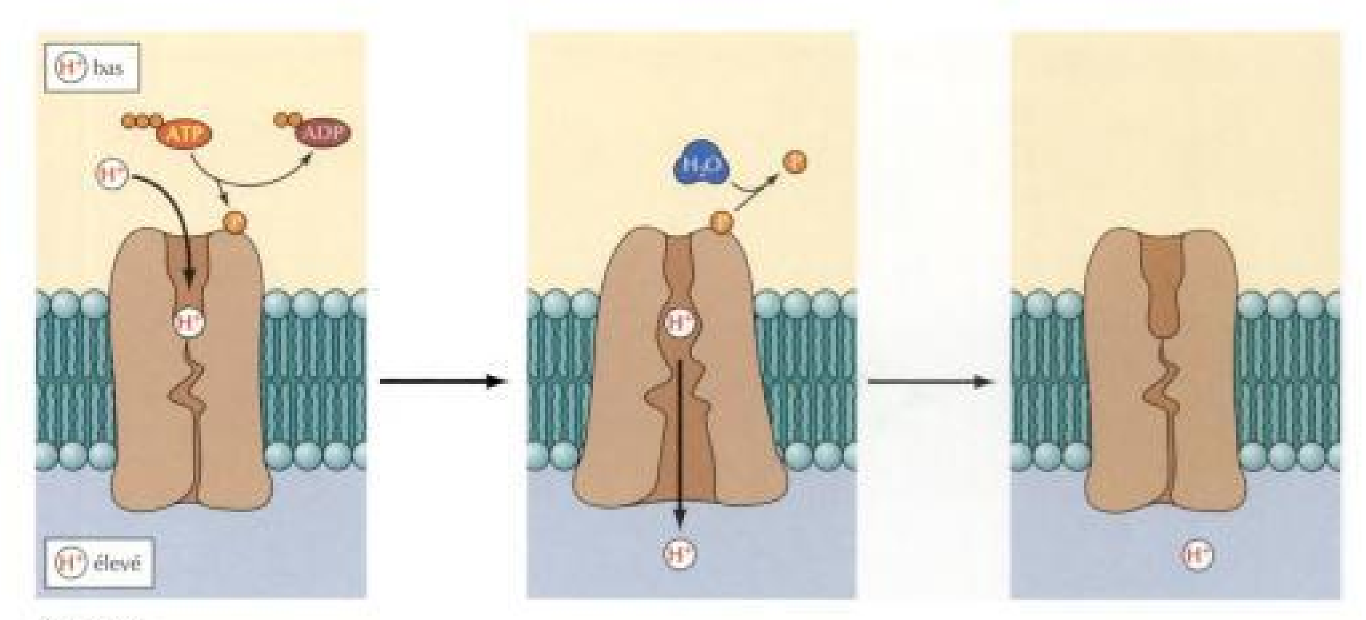


Figure 2.51
Modèle de transport actif. L'énergie issue de la rupture d'un ATP sert à transporter H^+ contre un gradient électrochimique (allant vers une concentration supérieure en H^+). La fixation de H^+ s'accompagne d'une phosphorylation de la protéine porteuse, y provoquant un changement de conformation qui pousse H^+ à remonter son gradient de concentration électrochimique. Le déchargement de H^+ et l'hydrolyse du groupe phosphoryle de la protéine remettent celle-ci dans sa conformation originelle.

cule particulier, puis changent de conformation pour ménager un pore par lequel la molécule est déchargée sur l'autre face de la membrane.

Les molécules transportées par les systèmes décrits jusqu'ici, conductines et perméases, traversent les membranes dans le sens énergétiquement favorisé, fixé par le gradient de concentration ou le gradient électrochimique, un processus appelé **transport passif**. Par contre, d'autres protéines porteuses, les **pompes**, mettent en jeu un mécanisme grâce auquel les variations d'énergie associées au transfert d'une molécule à travers une membrane sont couplées à la consommation ou à la production d'autres formes d'énergie métabolique, comme une réaction enzymatique peut être couplée à la rupture ou à la synthèse d'une molécule d'ATP. Ainsi, certaines molécules peuvent traverser une membrane dans le sens contraire aux lois de la thermodynamique (par exemple, contre leur gradient de concentration) à condition que leur passage dans ce sens soit couplé à une source d'énergie, comme la rupture d'une molécule d'ATP, un processus appelé **transport actif** (figure 2.51). L'énergie libre accumulée dans l'ATP sert donc non seulement à entraîner la synthèse des constituants cellulaires, mais aussi, dans ce cas, à ajuster la composition du cytoplasme cellulaire.

TERMES CLÉ

glucide, monosaccharide, liaison glycosidique, oligosaccharide, polysaccharide, glycogène, amidon, cellulose

lipide, acide gras, triacylglycérol, graisse, phospholipide, phospholipide à glycérol, sphingomyéline, amphipathique, glycolipide, cholestérol, hormone stéroïdienne

Résumé

COMPOSANTS MOLÉCULAIRES DE LA CELLULE

Glucides : Les glucides comprennent les sucres simples et les polysaccharides. Les polysaccharides servent de réserve de sucres, de soutien aux structures cellulaires et d'étiquettes pour les processus de reconnaissance entre cellules.

Lipides : Les lipides sont les constituants majeurs des membranes cellulaires et servent de réserve d'énergie et de molécules signalisatrices. Les phospholipides sont formés de deux chaînes d'acide gras liées à un groupe polaire hydrophile phosphorylé.

Acides nucléiques : Les acides nucléiques sont les principaux détenteurs d'information de la cellule. L'ADN et l'ARN sont des polymères de nucléotides de purines et de pyrimidines. Les liaisons hydrogène tendues entre paires de bases complémentaires permettent aux acides nucléiques de piloter leur propre réplication.

acide désoxyribonucléique (ADN), acide ribonucléique (ARN), ARN messager (ARNm), ARN ribosomial (ARNr), ARN de transfert (ARNt), nucléotide, purine, pyrimidine, adénine, guanine, cytosine, thymine, uracile, 2'-désoxyribose, ribose, nucléoside, liaison phosphodiester, oligonucléotide, polynucléotide

Protéines : Les protéines sont des polymères de 20 acides aminés différents, chacun avec sa chaîne latérale douée de propriétés chimiques singulières. Toute protéine possède une séquence d'acides aminés bien à elle, qui détermine sa structure tridimensionnelle. Dans la majorité des protéines, une combinaison d'hélices α et de feuillets β se reploie en domaines globulaires, les résidus d'acides aminés hydrophobes enterrés au sein de la protéine, les résidus hydrophiles affleurant à sa surface.

protéine, acide aminé, liaison peptidique, polypeptide, cristallographie aux rayons X, structure primaire, structure secondaire, hélice α, feuillet β, structure tertiaire, domaine, structure quaternaire

RÔLE CENTRAL DES ENZYMES COMME CATALYSEURS BIOLOGIQUES

Activité catalytique des enzymes : Pratiquement toutes les réactions chimiques se passant à l'intérieur d'une cellule sont catalysées par un enzyme.

enzyme, substrat, produit, état de transition, énergie d'activation, site actif

Mécanisme de la catalyse enzymatique : Un enzyme accélère une réaction en fixant les substrats dans la position optimale, en modifiant la conformation des substrats pour la rapprocher de celle de l'état de transition et en participant directement aux réactions chimiques.

modèle « clé dans la serrure », ajustement induit

Coenzymes : Les coenzymes agissent de concert avec les enzymes pour transférer des groupes chimiques d'un substrat à l'autre.

groupe prosthétique, coenzyme, nicotinamide-adénine dinucléotide (NAD^+)

Régulation de l'activité enzymatique : L'activité des enzymes est adaptée aux besoins physiologiques de la cellule. L'activité d'un enzyme est commandée par la fixation de petites molécules, par interaction avec d'autres protéines et par modification covalente.

rétro-inhibition, régulation allostérique, phosphorylation

ENERGIE MÉTABOLIQUE

Energie libre et ATP : L'ATP sert de réserve d'énergie libre que la cellule utilise pour entraîner ses réactions consommatrices d'énergie.

énergie libre de Gibbs (*G*), adénosine 5'-triphosphate (ATP), liaison riche en énergie

Formation d'ATP aux dépens de glucose : La dégradation du glucose est une des principales sources d'énergie. Dans la cellule aérobie, l'oxydation complète d'une molécule de glucose livre de 36 à 38 molécules d'ATP. La majeure partie de cet ATP provient des réactions de transfert d'électrons, dans lesquelles O_2 est réduit en H_2O.

glycolyse, coenzyme A (CoA), cycle du citrate, cycle de Krebs, flavine-adénine dinucléotide ($FADH_2$), oxydation phosphorylante (ou phosphorylation oxydante), chaîne de transfert d'électrons

Autres molécules organiques livrant de l'énergie : L'ATP vient aussi de la dégradation de molécules organiques autres que le glucose. Comme les graisses sont dans un état plus réduit que les glucides, ils constituent une réserve énergétique plus condensée.

Photosynthèse : L'énergie requise pour former les molécules organiques provient en dernier ressort de la lumière solaire, captée par les plantes et les bactéries photosynthétiques. Dans la première phase de la photosynthèse, l'énergie lumineuse sert à synthétiser de l'ATP et du NADPH, avec oxydation de H_2O en O_2. L'ATP et le NADPH produits par ces réactions servent ensuite à synthétiser du glucose à partir de CO_2 et H_2O.

réactions lumineuses, réactions sombres, pigment photosynthétique, chlorophylle, cycle de Calvin

BIOSYNTHÈSE DES CONSTITUANTS CELLULAIRES

gluconéogenèse

Glucides : La cellule fabrique du glucose avec d'autres composés organiques, aux dépens de l'énergie de l'ATP et du pouvoir réducteur du NADH. Il lui faut dépenser encore de l'ATP pour synthétiser des polysaccharides à partir de sucres simples.

Lipides : Les lipides sont synthétisés à partir d'acétyl-CoA, fourni par la dégradation des glucides.

fixation d'azote

Protéines : Les acides aminés sont synthétisés à partir d'intermédiaires de la glycolyse et du cycle du citrate. Leur polymérisation en protéines exige une dépense supplémentaire d'énergie, sous forme d'ATP et de GTP.

Acides nucléiques : Les nucléotides de purine et de pyrimidine sont synthétisés à partir de glucides et d'acides aminés. Leur polymérisation en ADN et ARN est entraînée par leur activation en précurseurs, sous forme de triphosphates de nucléoside.

MEMBRANES CELLULAIRES

bicouche phospholipidique

Lipides membranaires : La structure fondamentale des membranes consiste en une bicouche phospholipidique ; les membranes des cellules animales contiennent aussi des glycolipides et du cholestérol.

mosaïque fluide, protéine membranaire intrinsèque, protéine membranaire adventice, protéine transmembranaire

Protéines membranaires : Ces protéines sont soit noyées dans la bicouche lipidique, soit associées indirectement à la membrane, par le truchement d'interactions entre protéines. Certaines protéines occupent toute l'épaisseur de la membrane, d'autres sont ancrées sur une de ses faces.

protéine à tunnel (conductine), protéine porteuse (perméase), transport passif, transport actif

Transport à travers les membranes cellulaires : Les bicouches lipidiques ne sont perméables qu'aux petites molécules non chargées. Les ions et la plupart des molécules polaires passent les membranes cellulaires grâce à des protéines porteuses particulières, dont l'action peut être couplée à une rupture ou à une formation d'ATP.

QUESTIONNAIRE

1. Quel est le trait moléculaire singulier qui fait des phospholipides les constituants fondamentaux des membranes ?

2. Dans quelle partie d'une protéine reployée vous attendez-vous à trouver des résidus phénylalanine ? Quelle sortes de résidus d'acide aminé allez vous trouver dans les boucles de la chaîne polypeptidique unissant des hélices α successives ?

3. La fente de fixation de la trypsine comporte un résidu aspartate. De quelle façon sa conversion en une lysine modifierait-t-elle l'activité de l'enzyme ?

4. Considérons la réaction A $\rightleftharpoons$ B + C, dans laquelle $\Delta G^{\circ\prime}$ = +3,5 kcal/mol. Calculez ΔG dans les conditions régnant à l'intérieur de la cellule, quand la concentration de A est 10^{-2} M et la concentration de B et C de 10^{-3} M. Dans quel sens la réaction va-t-elle s'effectuer dans la cellule ? Dans vos calculs, $R = 1{,}98 \times 10^{-3}$ kcal mol^{-1}degré$^{-1}$ et T = 298 K (25 °C). Sachez que $\ln(x) = 2{,}3 \log_{10}(x)$.

5. Quel est le métabolite, à nombre de carbones égal, capable de fournir, par son catabolisme, le plus d'énergie libre, l'acide gras saturé ou l'acide gras insaturé ?

6. Pourquoi les enzymes en jeu dans la glycolyse sont-ils différents de ceux qui effectuent la gluconéogenèse ?

7. Pourquoi les régions des protéines transmembranaires qui sont noyées dans la bicouche sont-elles souvent de nature α-hélicoïdale ?

POUR EN SAVOIR PLUS

Références générales

Abeles, R. H., P. A. Frey, and W. P. Jencks. 1992. *Biochemistry*. Boston: Jones and Bartlett.

Branden, C. & Tooze, J. 1996. *Introduction à la structure des protéines*. Traduction de l'édition anglaise. De Boeck & Larcier.

Horton, H.R., Moran, L.A., Ochs, R.S., Rawn, J.D. & Scrimgeour, K.G. *Principes de Biochimie*. 1994. Traduction de l'édition américaine. De Boeck-Wesmael, Bruxelles.

Mathews, C. K., and K. E. van Holde. 1996. *Biochemistry*. 2nd ed. Redwood City, CA: Benjamin Cummings.

Stryer, L. 1995. *Biochemistry*. 4th ed. New York: W. H. Freeman.

Voet, D. & Voet, J.G. 1998. *Biochimie*. Traduction de la 2e édition américaine. De Boeck Université. Paris, Bruxelles.

Constituants moléculaires de la cellule

Anfinsen, C. B. 1973. Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181: 223–230. [P]

Branden, C. and J. Tooze. 1991. *Introduction to Protein Structure*. New York: Garland.

Chothia, C. and A. V. Finkelstein. 1990. The classification and origins of protein folding patterns. *Ann. Rev. Biochem.* 59: 1007–1039. [R]

Hunkapiller, M. W. and L. E. Hood. 1983. Protein sequence analysis: Automated microsequencing. *Science* 219: 650–655. [R]

Kendrew, J. C. 1961. The three-dimensional structure of a protein molecule. *Sci. Am.* 205(6): 96–111. [R]

Lhoste, J.M. *et al.* 1991. La structure des protéines «vue» par résonance magnétique nucléaire. *La Recherche* n°238:1518.

Pauling, L., R. B. Corey, and H. R. Branson. 1951. The structure of proteins: Two hydrogen bonded configurations of the polypeptide chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 37: 205–211. [P]

Richardson, J. S. 1981. The anatomy and taxonomy of protein structure. *Adv. Protein Chem.* 34: 167–339. [R]

Rost, B., R. Schneider, and C. Sander. 1993. Progress in protein structure prediction? *Trends Biochem. Sci.* 18: 120–123. [R]

Sanger, F. 1988. Sequences, sequences, and sequences. *Ann. Rev. Biochem.* 57: 1–28. [R]

Tanford, C. 1978. The hydrophobic effect and the organization of living matter. *Science* 200: 1012–1018. [R]

Rôle clé des enzymes comme catalyseurs des réactions biochimiques

Dressler, D. and H. Potter. 1991. *Discovering Enzymes*. New York: Scientific American Library.

Fersht, A. 1985. *Enzyme Structure and Mechanism*. 2nd ed. New York: W. H. Freeman.

Koshland, D. E. 1984. Control of enzyme activity and metabolic pathways. *Trends Biochem. Sci.* 9: 155–159. [R]

Lienhard, G. E. 1973. Enzymatic catalysis and transition-state theory. *Science* 180: 149–154. [R]

Lipscomb, W. N. 1983. Structure and catalysis of enzymes. *Ann. Rev. Biochem.* 52: 17–34. [R]

Lolis, E. and G. A. Petsko. 1990. Transition-state analogues in protein crystallography: probes of the structural source of enzyme catalysis. *Ann. Rev. Biochem.* 59: 597–630. [R]

Monod, J., J.-P. Changeux, and F. Jacob. 1963. Allosteric proteins and cellular control systems. *J. Mol. Biol.* 6: 306–329. [P]

Neurath, H. 1984. Evolution of proteolytic enzymes. *Science* 224: 350–357. [R]

Walsh, C. T. 1979. *Enzymatic Reaction Mechanisms*. New York: W. H. Freeman.

Énergie métabolique

Bennett, J. 1979. The protein that harvests sunlight. *Trends Biochem. Sci.* 4: 268–271. [R]

Calvin, M. 1962. The path of carbon in photosynthesis. *Science* 135: 879–889. [R]

Deisenhofer, J. and H. Michel. 1991. Structures of bacterial photosynthetic reaction centers. *Ann. Rev. Cell Biol.* 7: 1–23. [R]

Klotz, I. 1967. *Energy Changes in Biochemical Reactions*. New York: Academic Press.

Krebs, H. A. 1970. The history of the tricarboxylic cycle. *Perspect. Biol. Med.* 14: 154–170. [R]

Kuhlbrandt, W., D. N. Wang and Y. Fujiyoshi. 1994. Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography. *Nature* 367: 614–621. [P]

Nicholls, D. G. and S. J. Ferguson. 1992. *Bioenergetics* 2. London: Academic Press.

Biosynthèse des constituants cellulaires

Hers, H. G. and L. Hue. 1983. Gluconeogenesis and related aspects of glycolysis. *Ann. Rev. Biochem.* 52: 617–653. [R]

Jones, M. E. 1980. Pyrimidine nucleotide biosynthesis in animals: Genes, enzymes, and regulation of UMP biosynthesis. *Ann. Rev. Biochem.* 49: 253–279. [R]

Kornberg, A. and T. A. Baker. 1992. *DNA Replication*. 2nd ed. New York: W. H. Freeman.

Reichard, P. and A. Ehrenberg. 1983. Ribonucleotide reductase: A radical enzyme. *Science* 221: 514–519. [R]

Tolbert, N. E. 1981. Metabolic pathways in peroxisomes and glyoxysomes. *Ann. Rev. Biochem.* 50: 133–157. [R]

Umbarger, H. E. 1978. Amino acid biosynthesis and its regulation. *Ann. Rev. Biochem.* 47: 533–606. [R]

Van den Bosch, H., R. B. H. Schutgens, R. J. A. Wanders, and J.M. Tager. 1992. Biochemistry of peroxisomes. *Ann. Rev. Biochem.* 61: 157–197. [R]

Wakil, S. J., J. K. Stoops and V. C. Joshi. 1983. Fatty acid synthesis and its regulation. *Ann. Rev. Biochem.* 52: 537–579. [R]

Membranes de la cellule

Bretscher, M. 1985. Les molécules de la membrane cellulaire. *Pour la Science* n°98:66-78.

Clarke, S. 1992. Protein isoprenylation and methylation at carboxy-terminal cysteine residues. *Ann. Rev. Biochem.* 61: 355–386. [R]

Cross, G. A. M. 1990. Glycolipid anchoring of plasma membrane proteins. *Ann. Rev. Cell Biol.* 6: 1–39. [R]

Englund, P. T. 1993. The structure and biosynthesis of glycosyl phosphatidylinositol protein anchors. *Ann. Rev. Biochem.* 62: 121–138. [R]

Petty, H. R. 1993. *Molecular biology of membranes: Structure and function*. New York: Plenum Press.

Singer, S. J. 1990. The structure and insertion of integral proteins in membranes. *Ann. Rev. Cell Biol.* 6: 247–296. [R]

Singer, S. J. and G. L. Nicolson. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175: 720–731. [P]

Towler, D. A., J. I. Gordon, S. P. Adams and L. Glaser. 1988. The biology and enzymology of eukaryotic protein acylation. *Ann. Rev. Biochem.* 57: 69–99. [R]

Yeagle, P. L. 1993. *The Membranes of Cells*. 2nd ed. San Diego, CA: Academic Press.

3 Fondements de la biologie moléculaire

Aujourd'hui, la biologie moléculaire s'efforce surtout de saisir les mécanismes assurant la transmission et l'expression de l'information génétique, qui en fin de compte gouvernent la structure et le fonctionnement de la cellule. Comme on l'a montré au chapitre 1, les cellules partagent toutes un certain nombre de propriétés fondamentales ; cette unité inhérente à la biologie cellulaire apparaît surtout au niveau moléculaire. Cette unité a permis aux biologistes de choisir comme modèles des organismes assez simples (comme les bactéries) pour effectuer nombre d'expériences fondamentales, comptant sur le fait que des mécanismes essentiels semblables jouaient chez des organismes aussi éloignés que *E. coli* et l'Homme. Beaucoup de résultats expérimentaux ont confirmé la pertinence de cette assertion et il est clair à présent que la biologie moléculaire de la cellule nous offre une trame unificatrice pour saisir les divers aspects du comportement des cellules.

La biologie moléculaire doit ses premiers pas à l'avantage qu'elle tira de l'avancée rapide et de l'accessibilité immédiate de la génétique de bactéries aussi simples que *E. coli* et ses virus. Plus récemment, on a appliqué aux cellules d'eucaryotes non seulement les principes déduits du comportement des procaryotes, mais aussi les approches expérimentales mises au point d'abord chez ces procaryotes. L'explosion de la technologie de l'ADN recombinant a eu une influence considérable, car elle a permis d'isoler de nombreux gènes d'eucaryotes et de les caractériser minutieusement. Les progrès récents de cette technologie laissent même entrevoir la possibilité de bientôt séquencer entièrement le génome humain.

HÉRÉDITÉ, GÈNES ET ADN

Le trait distinctif de tous les êtres vivants est sans aucun doute leur pouvoir de se reproduire. Les organismes héritent tous de l'information génétique qui commande leur structure et leurs fonctions. Toute cellule est aussi issue d'une cellule préexistante, de sorte que le matériau génétique doit se répliquer et passer de la cellule mère à ses descendants à chaque division. Une question cruciale pour le biologiste a donc toujours été de savoir comment l'information génétique se reproduit et se transmet de cellule à cellu-

le et d'organisme à organisme : aussi, l'élucidation des mécanismes de la transmission génétique et l'identification du matériau génétique à l'ADN sont-elles des découvertes qui ont scellé les assises de notre compréhension actuelle de la biologie au plan moléculaire.

Gènes et chromosomes

Les principes classiques de la génétique furent établis par Gregor Mendel en 1865, sur la base des résultats qu'il obtint grâce à ses cultures expérimentales de pois. En suivant la transmission d'un certain nombre de traits bien définis, comme la couleur des graines, Mendel put élaborer les principes généraux de leur transmission ; chaque fois, il savait interpréter correctement les profils de transmission observés en supposant que chaque trait est déterminé par une paire de facteurs héritables, que nous appelons à présent **gènes**. Un membre de cette paire (appelé **allèle**) qui spécifie un trait donné provient de chacun des parents ; ainsi en croisant deux variétés de pois — l'une à graines jaunes, l'autre à graines vertes — obtint-il les résultats que voici (figure 3.1). Chaque souche parentale possède deux exemplaires identiques du gène spécifiant soit le trait jaune (*J*) soit le trait vert (*j*) de la graine. Les descendants directs de ces parents sont donc, pour ce gène, des hybrides, puisqu'ils ont hérité le gène des graines jaunes (*J*) et le gène des graines vertes (*j*) ; comme toutes les plantes de cette génération (première génération, ou F_1) possèdent des graines jaunes, on dit que le jaune (*J*) est **dominant** et le vert (*j*) **récessif**. Le **génotype** (composition génétique) des pois F_1 est donc *Jj* et leur **phénotype** (apparence physique) est jaune. Quand on croise un individu F_1 avec un autre individu F_1 pour obtenir des descendants F_2, les gènes de la couleur jaune et de la couleur verte des graines se répartissent de telle manière que le nombre de plantes F_2 à graines jaunes et le nombre de plantes F_2 à graines vertes sont dans le rapport de 3 à 1.

La découverte de Mendel, sans aucun doute bien en avance sur son temps, fut ignorée jusqu'en 1900, année où on la remit au jour et où on reconnut toute sa portée. Peu après, on proposa le **chromosome** comme dépositaire des gènes. Il s'avérait que la plupart des cellules d'animaux et de plantes supérieurs étaient **diploïdes**, c'est-à-dire possédaient deux

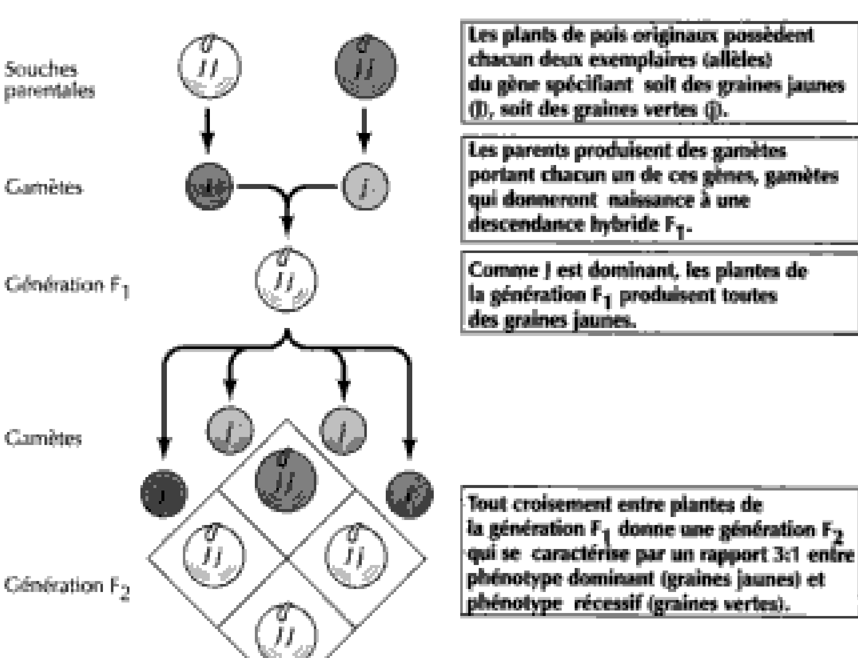


Figure 3.1
Transmission de gènes dominant et récessif

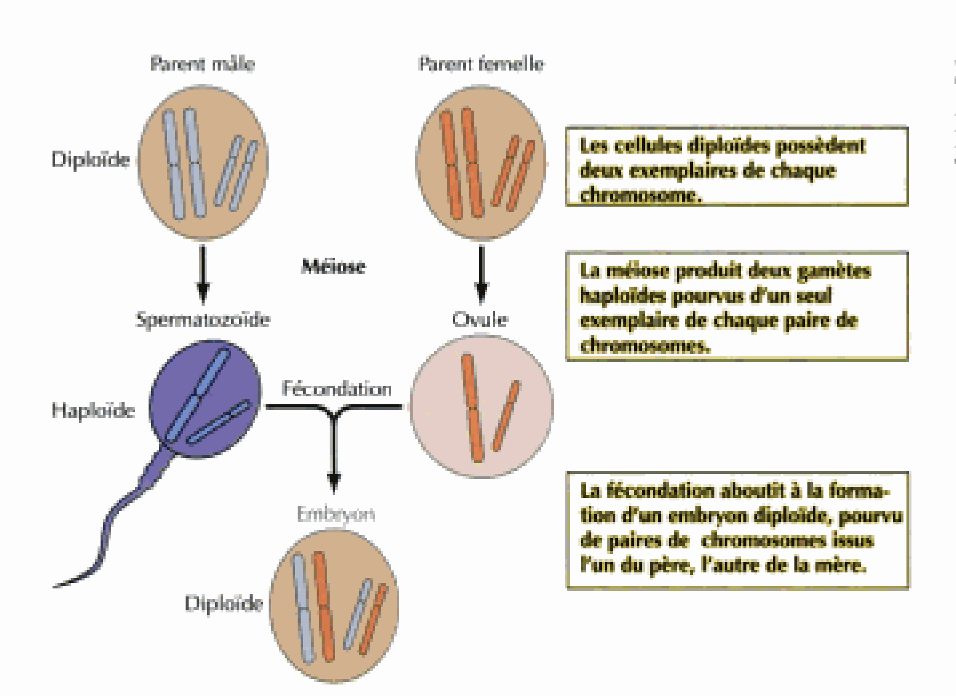


Figure 3.2
Chromosomes méiotiques et fécondation. On a dessiné deux paires de chromosomes d'un organisme hypothétique.

exemplaires de chaque chromosome. La formation des cellules germinales (ovule et spermatozoïde) fait cependant intervenir un type particulier de division cellulaire (**méiose**) dans laquelle un seul exemplaire de chaque chromosome est transmis à chaque cellule fille (figure 3.2) ; aussi, l'ovule et le spermatozoïde sont-ils **haploïdes**, c'est-à-dire qu'ils ne possèdent qu'un seul exemplaire de chaque chromosome. Au moment de la fécondation, l'union de ces deux cellules haploïdes engendre un nouvel organisme diploïde, porteur d'un exemplaire de chaque chromosome hérité du père et d'un exemplaire de chaque chromosome hérité de la mère. Les paires de chromosomes se comportent donc comme les gènes, ce qui permit d'en déduire que les gènes sont portés par les chromosomes.

L'essence de la mutation, de la liaison génétique et des rapports entre gènes et chromosomes fut tirée principalement des expériences effectuées sur la mouche du vinaigre *Drosophila melanogaster*. On sait facilement faire l'élevage de cette mouche, qui se reproduit en deux semaines, un avantage considérable pour les expériences de génétique ; c'est pourquoi la drosophile reste l'organisme rêvé pour l'étude génétique des animaux, notamment de leur développement embryonnaire et de la différenciation de leurs tissus.

Au début des années 1900, on identifia chez la drosophile de nombreuses altérations génétiques (**mutations**) touchant des traits faciles à observer, comme la couleur de l'œil et la forme de l'aile. Les expériences de croisement indiquaient que ces traits se transmettaient indépendamment l'un de l'autre ; cela s'expliquait si les gènes correspondants résident chacun sur un chromosome particulier qui se répartit de façon indépendante des autres chromosomes à la méiose (figure 3.3). Cependant, d'autres gènes se transmettent fréquemment de concert en tant que paires typiques ; on dit qu'ils sont liés l'un à l'autre du fait de résider sur le même chromosome. Le nombre de groupes de gènes liés est identique au nombre de chromosomes (quatre chez la drosophile), ce qui appuie la proposition selon laquelle les chromosomes sont le support des gènes.

La liaison des gènes n'est pourtant pas complète, car les chromosomes échangent du matériel au cours de la méiose, en donnant une **recombinaison** entre des gènes liés (figure 3.4). La fréquence de recombinaison entre deux gènes liés dépend de la distance qui les sépare sur le chromosome : deux gènes très voisins se recombinent moins fréquemment que deux

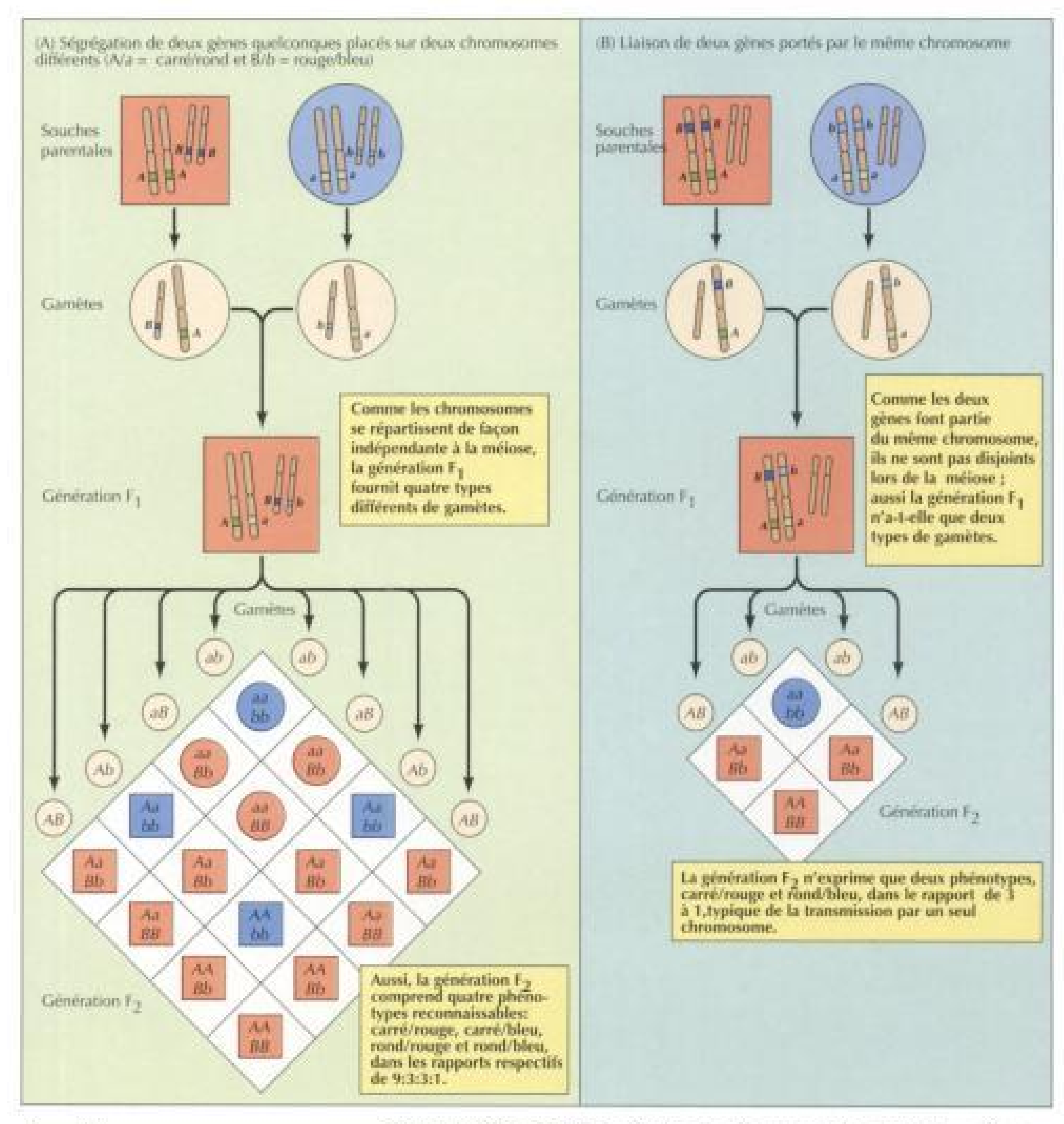


Figure 3.3
Ségrégation de gènes et liaison de gènes. (A) Ségrégation de deux gènes quelconques, l'un pour la forme (*A*/*a* = carré/rond) et l'autre pour la couleur (*B*/*b* = rouge/bleu), placés sur deux chromosomes différents. (B) Liaison de deux gènes résidant sur un même chromosome.

gènes plus distants l'un de l'autre. La fréquence à laquelle deux gènes se recombinent peut donc servir à déterminer leur position relative sur un chromosome, ce qui permet de construire des **cartes génétiques** (figure 3.5). Dès 1915, on avait défini près de cent gènes et on avait trouvé leur place sur les quatre chromosomes de la drosophile : les biologistes ne doutaient plus que le chromosome fût le support de l'hérédité.

Gènes et enzymes

Les premières études génétiques tâchaient d'identifier et de localiser sur les chromosomes des gènes qui commandent des traits bien visibles, comme la couleur de l'œil de la drosophile, sans cependant rien apprendre sur la voie

par laquelle ces gènes gouvernent le phénotype. C'est en 1909 que l'on suspecta pour la première fois le rapport entre un gène et un enzyme, à savoir qu'une maladie congénitale humaine appelée phénylcétonurie (voir médecine moléculaire, au chapitre 2) est due à un trouble génétique du métabolisme d'un acide aminé, la phénylalanine. En supposant que cette défaillance provenait d'un déficit de l'enzyme qui catalyse la réaction métabolique concernée, on fut amené à penser qu'un gène donné dicte la synthèse d'un enzyme.

Cette idée de liaison d'un gène avec la synthèse d'un enzyme fut confirmée par les expériences de George Beadle et Edward Tatum effectuées en 1941 sur le champignon *Neurospora crassa*. Au laboratoire, on cultive *Neurospora* en milieu minimal ou en milieu riche, comme on l'a décrit au chapitre 1 pour *E. coli*. Pour *Neurospora*, un milieu minimal ne comporte que des sels, du glucose et de la biotine, mais on en fait un milieu riche en y ajoutant des acides aminés, des vitamines, des purines et des pyrimidines. Beadle et Tatum isolèrent des mutants de *Neurospora* qui poussaient normalement en milieu riche, mais ne poussaient pas en milieu minimal. On s'aperçut que chacun des mutants exigeait pour proliférer un nutriment supplémentaire particulier, par exemple un acide aminé donné ; en outre, cette exigence nutritionnelle allait de pair avec l'incapacité qu'avait ce mutant de synthétiser cette substance. Chaque mutation consistait donc à invalider une étape particulière d'une voie métabolique connue. Comme on savait que ces voies métaboliques étaient gouvernées par des enzymes, on pouvait conclure de ces expériences que chaque gène spécifiait la structure d'un enzyme unique : c'est la thèse de la corrélation entre **un gène** et **un enzyme.** On sait maintenant que beaucoup d'enzymes sont formés de plusieurs polypeptides, de sorte que la thèse, à présent générale, est que chaque gène spécifie la structure d'une chaîne polypeptidique singulière.

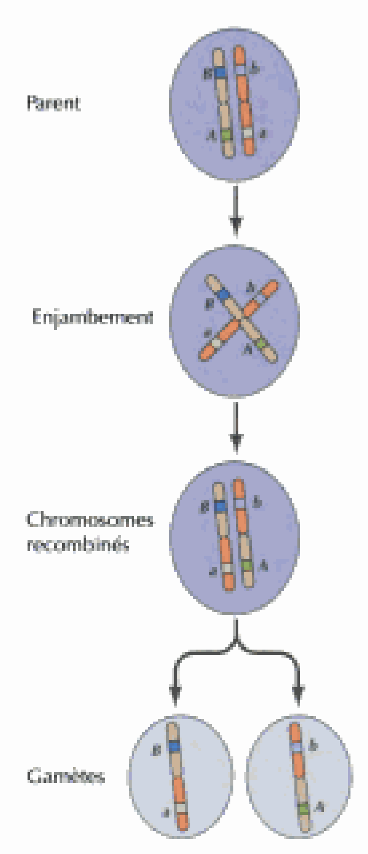


Figure 3.4
Recombinaison de gènes. Lors de la méiose, les membres d'une paire de chromosomes échangent de la matière, résultant en une recombinaison entre gènes liés.

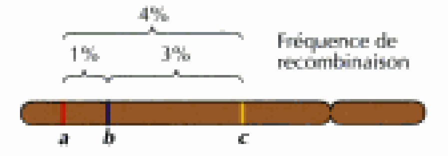
Identification du matériau génétique à l'ADN

Le fait de savoir que le chromosome est le dépositaire de l'hérédité et qu'il existe un rapport entre gène et enzyme ne suffisait cependant pas à expliquer la nature du gène au niveau moléculaire. Les chromosomes comportent à la fois de l'ADN et des protéines, et on a cru d'abord que les protéines étaient le support des gènes. La première indication qui identifiait le matériau génétique à l'ADN vint des bactériologistes. Leurs expériences servent de prototype aux approches suivies maintenant pour définir la fonction d'un gène, à savoir introduire de nouvelles séquences d'ADN dans une cellule, comme on va le montrer plus loin dans ce chapitre.

Les expériences qui permirent de définir le rôle de l'ADN proviennent de travaux effectués sur une bactérie responsable de la pneumonie (*Pneumococcus*). Les souches virulentes de pneumocoque portent à leur surface une capsule qui protège la bactérie contre les attaques du système immunitaire de l'hôte ; comme cette capsule donne un aspect lisse aux colonies bactériennes en culture, on désigne celles-ci par la lettre S (*smooth*, en anglais), alors que les mutants incapables de construire une capsule (désigné R, pour *rough*, en anglais) forment des colonies à bords irréguliers, rugueux, et que leur injection à la souris ne provoque plus d'infection mortelle. En 1928, on remarqua que des souris inoculées avec un mélange de bactéries non encapsulées (R) vivantes et de bactéries encapsulées (S) tuées par la chaleur développaient une pneumonie mortelle ; il est crucial de remarquer que les bactéries isolées ensuite de ces souris étaient de type S. D'autres expériences montrèrent ensuite qu'un extrait acellulaire de colonies de type S était également capable de transformer des bactéries de type R en bactéries de type S. L'extrait de cellules S contient donc une substance (appelé principe transformant) qui peut induire la **transformation** génétique du type bactérien R en type S.

En 1944, Oswald Avery, Colin MacLeod and Maclyn McCarty démontrèrent que le principe transformant était de l'ADN : d'une part, ils le puri-

Figure 3.5
Exemple de carte génétique Sur un chromosome quelconque, on a espacé trois gènes selon leur fréquence réciproque de recombinaison (1 % entre *a* et *b*, 3 % entre *b* et *c*, 4 % entre *a* et *c*). La fréquence de recombinaison de deux gènes est à peu près proportionnelle à la distance qui les sépare sur le chromosome.



fièrent à partir d'extraits bactériens et, d'autre part, démontrèrent que l'activité du principe transformant était détruite par digestion enzymatique de l'ADN, mais pas par digestion enzymatique des protéines (figure 3.6). Si les conclusions de ces travaux ne furent pas vite acceptées comme preuves de l'identification du matériel génétique à l'ADN, on se mit, dans les années suivantes, à répéter ces expériences en employant des virus bactériens. On montra notamment que, quand un virus bactérien infecte une cellule, c'est l'ADN viral et non les protéines virales qui doivent pénétrer dans la cellule pour que le virus se multiplie ; en outre, c'est l'ADN (et non les protéines) du virus parental qui est transmis aux virions fils. La concordance de ces résultats avec ceux d'études ultérieures sur l'activité de l'ADN dans la transformation bactérienne fit accepter par tous les biologistes l'idée que l'ADN constitue le matériau génétique.

Structure de l'ADN

La biologie moléculaire d'aujourd'hui repose tout entière sur notre compréhension de la stucture de l'ADN telle que l'ont formulée James Watson et Francis Crick en 1953. À l'époque des travaux de Watson et Crick, on savait que l'ADN était un polymère composé de quatre type de bases–deux purines, l'adénine (A) et la guanine (G) et deux pyrimidines, la cytosine (C) et la thymine (T)–attachées à des sucres phosphorylés. Vu le rôle central tenu par l'ADN en tant que matériau génétique, il paraissait capital de connaître sa structure avant de pouvoir saisir son fonctionnement. L'approche du problème par Watson et Crick fut très influencée par la description que fit Linus Pauling des liaisons hydrogène de l'hélice α, un trait de la structure secondaire de toutes les protéines (voir chapitre 2). De plus, les travaux de cristallographie par les rayons X effectués par Maurice Wilkins et Rosalind Franklin avaient fourni des données concrètes sur la structure tridimensionnelle de l'ADN. L'examen de ces données révéla que la molécule d'ADN était une hélice de pas égal à 3,4 nm et que 0,34 nm séparait chaque base de ses voisines, c'est-à-dire qu'un tour d'hélice englobait 10 bases. Une donnée importante était que le diamètre de l'hélice

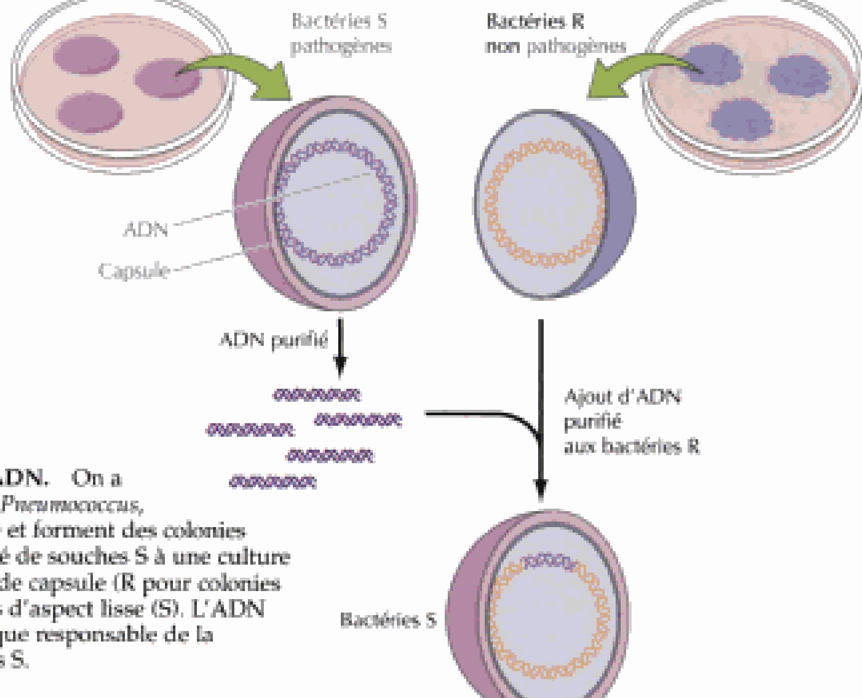


Figure 3.6
Transfert d'information génétique par l'ADN. On a extrait l'ADN d'une souche pathogène de *Pneumococcus*, dont les cellules s'entourent d'une capsule et forment des colonies lisses (S). Quand on ajoute cet ADN purifié de souches S à une culture de bactéries non pathogènes, dépourvues de capsule (R pour colonies rugueuses), on voit apparaître des colonies d'aspect lisse (S). L'ADN purifié contient donc l'information génétique responsable de la transformation des bactéries R en bactéries S.

approchait les 2 nm, suggérant que l'hélice comportait deux chaînes d'ADN plutôt qu'une.

À partir de ces données, Watson et Crick établirent leur modèle de la molécule d'ADN (figure 3.7). Le point capital du modèle est que l'ADN est une hélice double dont le squelette sucre-phosphate court à l'extérieur de la molécule ; les bases sont à l'intérieur, orientées de telle façon qu'il se forme des liaisons hydrogène entre purines d'une chaîne et pyrimidines de la chaîne opposée. L'appariement des bases est tout à fait singulier : A s'apparie toujours à T et G toujours à C. Cette spécificité est en accord avec les observations antérieures de Erwin Chargaff ; en analysant la composition en bases de tout une série d'ADN, il avait remarqué que le taux d'adénine y était toujours égal au taux de thymine, celui de guanine toujours égal à celui de cytosine. Comme les bases s'apparient de façon tellement particulière, les deux brins d'ADN sont complémentaires, c'est-à-dire qu'un des brins contient toute l'information requise pour déterminer la séquence des bases de l'autre brin.

Réplication de l'ADN

La découverte de l'appariement complémentaire des bases d'un brin d'ADN à celles de l'autre brin d'ADN suggérait aussitôt qu'on pouvait

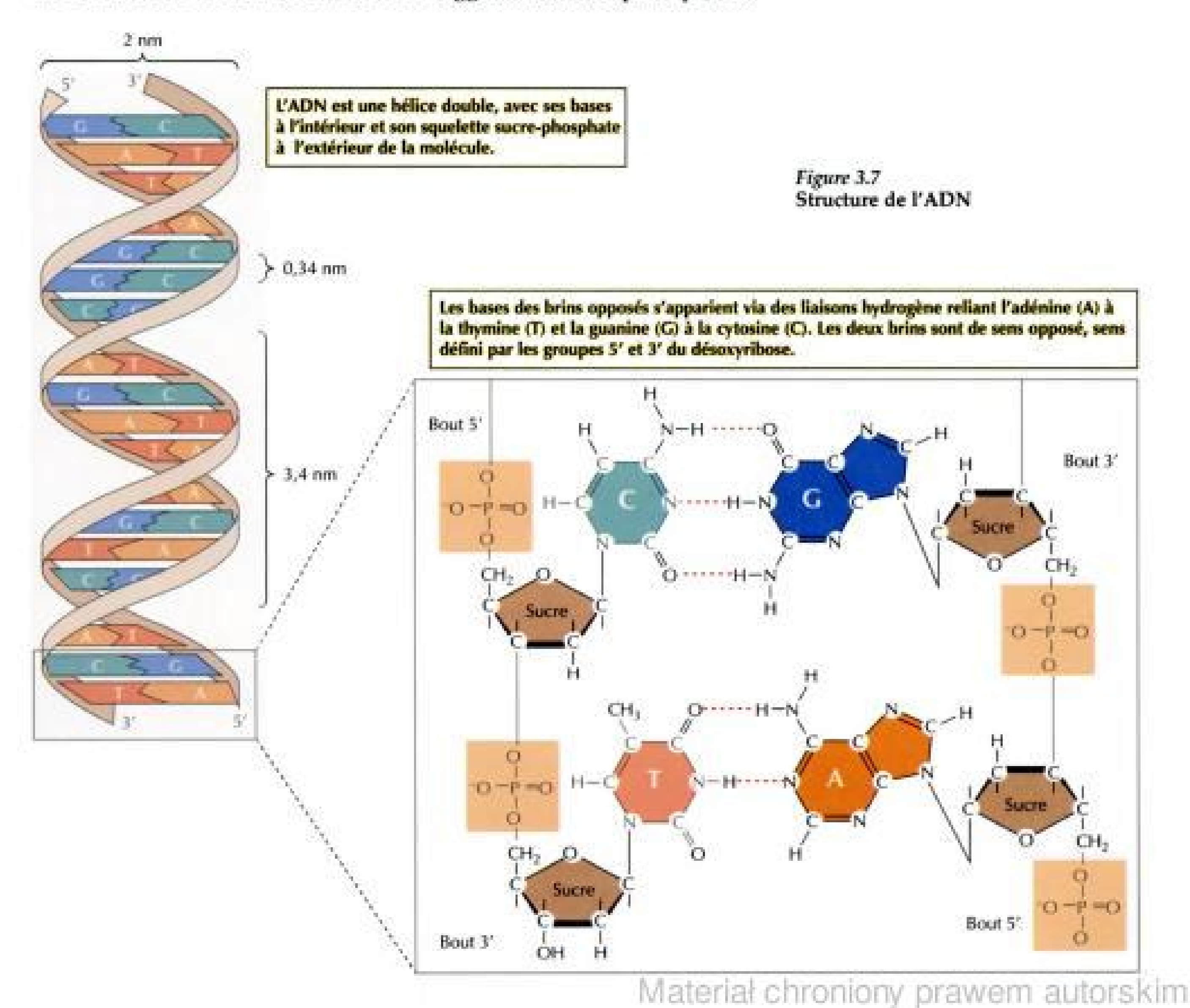


Figure 3.7
Structure de l'ADN

répondre, au plan moléculaire, à la question de savoir comment le matériel génétique gouvernait sa propre réplication–un processus remis en jeu à chaque division cellulaire. On proposa que les deux brins de la molécule d'ADN se séparaient et servaient chacun de matrice pour la synthèse d'un nouveau brin, complémentaire, dont la séquence était dictée par la spécificité de l'appariement des bases (figure 3.8). Ce processus porte le nom de **réplication semi-conservatoire**, car on retrouve un des brins parentaux d'ADN dans chacune des molécules-filles d'ADN.

Ce fait fut directement prouvé en 1958, par d'élégantes expériences dans lesquelles Matthew Meselson et Frank Stahl introduisirent dans l'ADN des isotopes qui en modifiaient la densité (figure 3.9). Ils cultivèrent *E. coli* dans un milieu où ils avaient remplacé l'isotope naturel de l'azote (^{14}N) par son isotope lourd (^{15}N) ; l'ADN de ces bactéries contenant l'atome ^{15}N était ainsi plus lourd que celui de bactéries cultivées en présence d'azote ^{14}N. Comme il était possible de séparer ces deux types d'ADN par une centrifugation à l'équilibre en gradient de CsCl, on avait le moyen d'étudier la synthèse des molécules d'ADN. Les bactéries *E. coli* qui avaient poussé dans un milieu pourvu de l'atome ^{15}N furent transférées dans un milieu pourvu de l'atome ^{14}N et on les laissa s'y diviser une seule fois. On procéda à l'extraction de leur ADN, que l'on centrifugea à l'équilibre dans un gradient de CsCl. À l'examen des bandes du gradient, on s'aperçut que tout l'ADN lourd de la culture bactérienne de départ avait été remplacé par de l'ADN nouvellement synthétisé, d'une densité intermédiaire entre celle de l'ADN lourd (^{15}N) et celle de l'ADN léger (^{14}N). Ceci signifiait que, pendant la réplication, les deux brins lourds d'ADN parental s'étaient séparés pour servir de matrice à la synthèse de deux nouveaux brins-fils légers, résultant en molécules bicaténaires de densité intermédiaire. Ceci prouvait directement que l'ADN se réplique selon le mode semi-conservatoire et soulignait l'importance de l'appariement complémentaire entre bases opposées des brins composant l'hélice double.

On put ensuite confirmer le pouvoir qu'a l'ADN de servir de matrice pour sa propre réplication en montrant qu'un enzyme purifié à partir d'extraits de *E. coli* (**ADN polymérase**) catalysait la réplication d'une molécule d'ADN *in vitro*. En présence d'ADN comme matrice, cette ADN polymérase était capable d'incorporer les nucléotides appropriés pour fabriquer le brin d'ADN complémentaire.

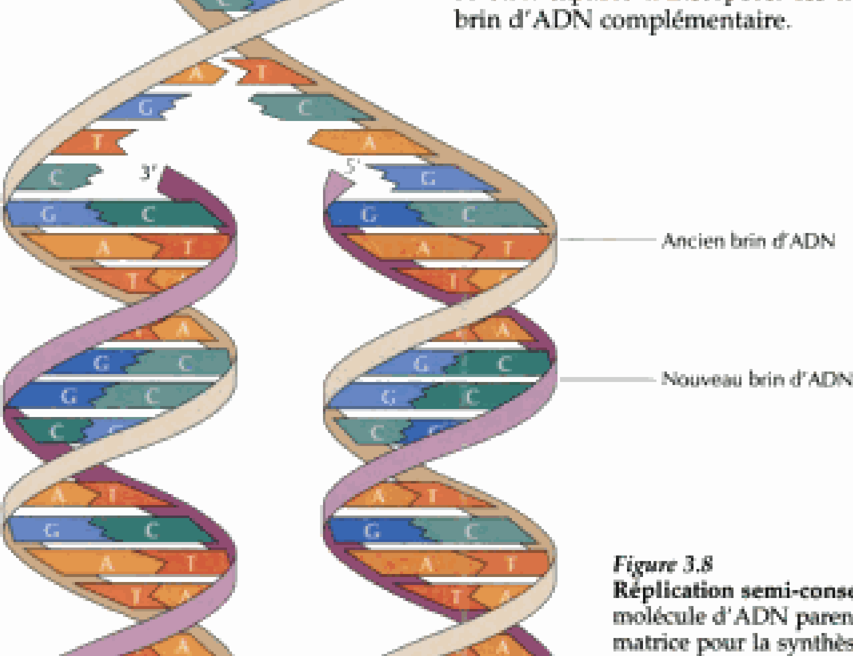


Figure 3.8
Réplication semi-conservatoire de l'ADN. Les deux brins de la molécule d'ADN parentale se séparent et chacun sert alors de matrice pour la synthèse d'une chaîne fille nouvelle, synthèse dirigée par appariement des bases complémentaires.

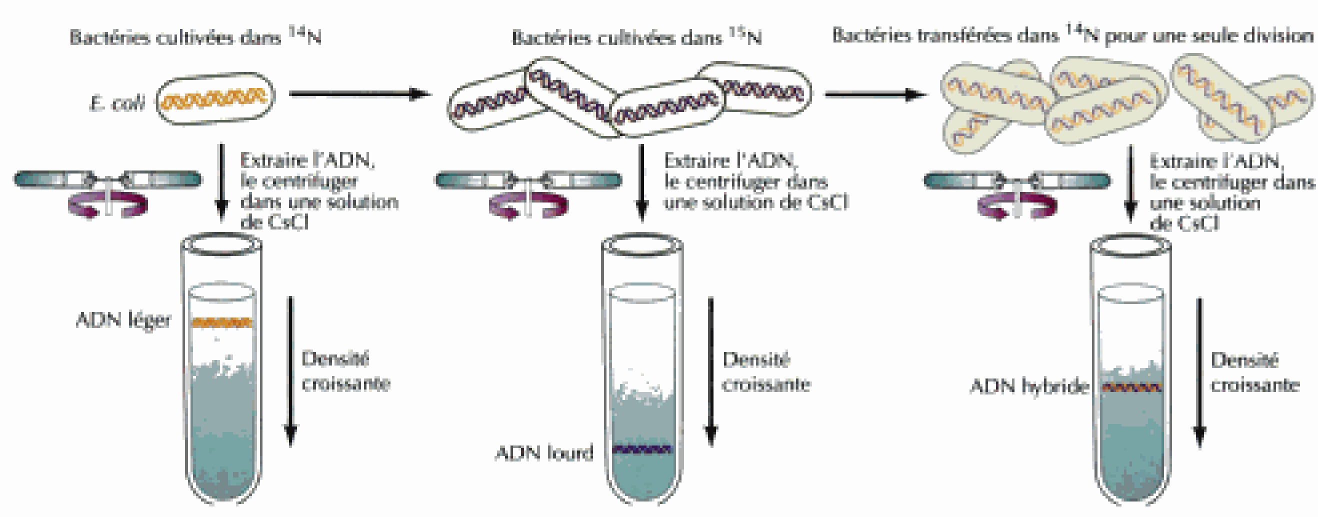


Figure 3.9
Démonstration expérimentale de la réplication semi-conservatoire. On récolte un échantillon de bactéries ayant poussé dans un milieu pourvu de l'isotope normal de l'azote (^{14}N) et on le transfère dans un milieu de culture pourvu exclusivement de l'isotope lourd de l'azote (^{15}N) ; on laisse les bactéries s'y diviser un très grand nombre de fois. On en récolte un échantillon que l'on retransfère dans le milieu pourvu d'azote léger ^{14}N ; on y laisse les bactéries se diviser une seule fois. On extrait l'ADN de ces trois échantillons et on les centrifuge à l'équilibre dans un gradient de densité constitué par une solution de CsCl. Sous l'effet de la gravitation, CsCl sédimente pour former un gradient de densité dans lequel les molécules d'ADN migrent jusqu'à une position correspondant à leur densité propre. L'ADN des bactéries transférées, pour une génération, du milieu à ^{15}N au milieu à ^{14}N va se placer à une distance intermédiaire entre celle de l'ADN ^{15}N et celle de l'ADN ^{14}N, preuve qu'il est un hybride moléculaire constitué d'un brin lourd et d'un brin léger.

EXPRESSION DE L'INFORMATION GÉNÉTIQUE

Les gènes agissent en déterminant la structure des protéines, qui, elles, gouvernent le métabolisme cellulaire *via* leur activité enzymatique. L'identification du matériau génétique à l'ADN et l'élucidation de la structure de ce dernier ont révélé que l'information génétique doit être prescrite par l'ordre dans lequel se suivent les quatre bases (A, C, G et T) le long du brin d'ADN. Quant aux protéines, ce sont des polymères de 20 résidus d'acide aminé, dont la séquence détermine la structure et la fonction. Le premier lien direct entre une mutation génétique et une erreur dans la séquence d'une protéine fut établi en 1957 : on découvrit que les patients atteints de la maladie congénitale appelée anémie falciforme possédaient des molécules d'hémoglobine différant des molécules normales par la substitution d'un seul résidu d'acide aminé. On comprit cependant mieux, au niveau moléculaire, le rapport entre ADN et protéines quand on mena toute une série d'expériences tirant profit de *E. coli* et de ses virus en tant que modèles génétiques.

Colinéarité d'un gène et de sa protéine

L'hypothèse la plus simple pour rendre compte du rapport entre gène et enzyme était que l'ordre des nucléotides d'un ADN spécifiât l'ordre des résidus d'acide aminé dans la chaîne protéique correspondante (une translittération). Toute mutation d'un gène devait correspondre à une altération de la séquence des bases de l'ADN, due, semblait-il, à la substitution d'un nucléotide par un autre ou bien à une délétion ou à une addition de nucléotide. Ces modifications de la séquence nucléotidique d'un ADN entraînaient alors les modifications correspondantes de la séquence des résidus d'acide aminé de la protéine codée par le gène en question. Cette hypothèse permettait de prévoir que diverses mutations d'un gène donné modifieraient différents résidus de la protéine codée par ce gène et que la position de ces mutations le long du gène refléterait la position des résidus d'acide aminé modifiés dans la protéine traduite de ce gène.

La réplication rapide de *E. coli* et la simplicité de son système génétique furent des atouts importants pour résoudre ces problèmes. On pouvait isoler toute une séries de mutants de *E. coli*, parmi lesquels des mutants nutritionnels (comme les mutants de *Neurospora* déjà décrits) qui ne poussent pas en l'absence de certains facteurs de croissance dans le milieu ; on profitait surtout du fait que la croissance rapide de *E. coli* permettait d'isoler et de cartographier de nombreuses mutations d'un même gène, ce qui démontrait pour la première fois le rapport de colinéarité entre gène et protéine. Charles Yanofsky et son équipe localisèrent une série de mutations

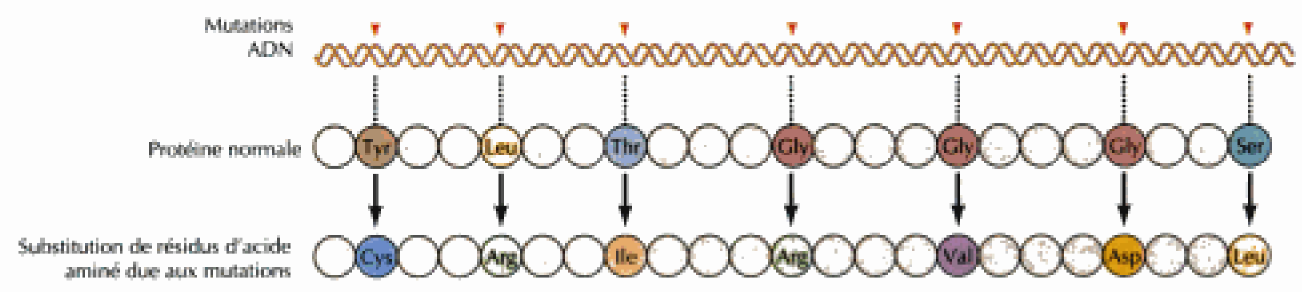


Figure 3.10
Colinéarité du gène avec sa protéine. On localisa une série de mutations (pointes de flèche) dans le gène de *E. coli* codant la synthétase du tryptophane (ligne du haut). En séquençant ensuite l'enzyme des bactéries mutées, on détermina la substitution d'acide aminé correspondant à chacune des mutations (ligne inférieure). On s'aperçut que l'ordre des mutations de l'ADN était identique à celui des substitutions de résidus d'acide aminé dans la protéine codée.

du gène qui code un enzyme nécessaire à la synthèse du tryptophane. L'examen des divers enzymes codés par ces différents mutants montra que la position relative des résidus d'acide aminé modifiés y étaient la même que celle des mutations correspondantes (figure 3.10). C'est dire que la séquence des résidus d'acide aminé d'une protéine est colinéaire à celle des mutations de son gène, comme on doit s'y attendre si l'ordre des résidus nucléotidiques d'un ADN donné détermine l'ordre des résidus d'acide aminé de sa protéine.

Rôle de l'ARN messager

Même si, à première vue, la séquence nucléotidique d'un ADN dicte l'ordre des résidus d'acide aminé de sa protéine, on ne peut pas en conclure que c'est l'ADN qui gouverne seul la synthèse de cette protéine ; on s'aperçut en effet du contraire, car l'ADN est confiné au noyau de la cellule eucaryotique, alors que la synthèse des protéines a lieu dans son cytoplasme. Une autre molécule devait intervenir pour transmettre l'information génétique portée par l'ADN aux sites qui effectuent la synthèse des protéines (les ribosomes).

L'ARN paraissait tenir ce rôle, car la similarité de sa structure avec celle de l'ADN suggérait que l'ARN pouvait se former sur une matrice d'ADN (figure 3.11). L'ARN diffère de l'ADN par le fait qu'il est monocaténaire et non bicaténaire, que son composant glucidique n'est pas le désoxyribose, mais le ribose, et que sa base pyrimidinique est l'uracile (U) en place de la thymine (T)(voir figure 2.10). Le changement d'espèce glucidique ni le remplacement de T par U ne modifient l'appariement des bases, de sorte que l'ARN peut être directement synthétisé sous la direction d'une matrice d'ADN. En outre, comme l'ARN se trouvait surtout dans le cytoplasme, il apparut comme l'intermédiaire logique pour passer l'information de l'ADN aux ribosomes. Ces traits de l'ARN suggérèrent l'idée, connue à présent sous le nom de **postulat central** de la biologie moléculaire, que le flux d'information génétique suit le chemin suivant :

$$\text{ADN} \rightarrow \text{ARN} \rightarrow \text{Protéine}$$

Selon ce concept, les molécules d'ARN sont synthétisées sur une matrice d'ADN (un processus appelé **transcription**) et les protéines sont synthétisées sur une matrice d'ARN (un processus appelé **traduction**).

La preuve expérimentale du rôle des intermédiaires d'ARN imaginés par ce postulat central fut apportée par Sidney Brenner, François Jacob et



Figure 3.11
Synthèse d'ARN à partir d'ADN. Les deux brins d'ADN se détordent et l'un d'eux sert de matrice pour la synthèse d'un brin d'ARN complémentaire.

Matthew Meselson, grâce à leurs travaux sur la bactérie *E. coli* infectée par le bactériophage T4. Chez *E. coli*, la synthèse d'ARN s'arrête dès que la cellule est infectée par T4 et les seuls ARN alors néoformés sont transcrits de l'ADN de T4 ; ces ARN de T4 s'associent aux ribosomes bactériens, témoignage du transfert de l'information portée par l'ADN au site de synthèse des protéines. Vu leur rôle d'intermédiaires dans le flux d'information génétique, les molécules d'ARN qui servent de matrice pour la synthèse de protéines sont appelées **ARN messagers (ARNm)** ; ils sont transcrits par un enzyme (l'**ARN polymérase**) qui catalyse la synthèse d'ARN sur une matrice d'ADN.

Outre les ARNm, deux types d'ARN participent aussi à la synthèse protéique : l'**ARN ribosomial (ARNr)** fait partie du ribosome et l'**ARN de transfert (ARNt)** sert d'adaptateur moléculaire pour aligner les résidus d'acide aminé le long de la matrice d'ARN. La section suivante et mieux encore les chapitres 6 et 7 décriront la structure et le rôle de ces molécules.

Code génétique

Comment la séquence nucléotidique d'un ARNm est-elle traduite en séquence d'acides aminés d'une protéine ? Au cours de cette étape de l'expression d'un gène, l'information génétique passe d'un type de macromolécule à un type entièrement étranger au premier–acide nucléique à protéine–soulevant deux types inattendus de questions quant au mode d'action des gènes.

La première difficulté rencontrée était la suivante : comme la structure des acides aminés n'a aucune parenté avec celle des bases des acides nucléiques, on ne pouvait imaginer la moindre complémentarité directe entre la matrice d'ARNm et les acides aminés au cours de leur incorporation dans la protéine. La question se posait donc de savoir par quel mécanisme les acides aminés s'alignaient sur une matrice d'ARNm pendant la synthèse d'une chaîne polypeptidique. La question fut résolue quand on découvrit que les ARNt servent d'adaptateurs entre les acides aminés et la matrice d'ARNm au cours de la traduction (figure 3.12). Avant d'être incorporé à la chaîne protéique, chaque acide aminé est attaché à un ARNt approprié par un enzyme particulier ; l'appariement des bases d'une séquence de reconnaissance de chaque ARNt à une séquence complémentaire de l'ARNm entraîne ensuite l'acide aminé ainsi attaché vers la position correcte sur la matrice d'ARNm.

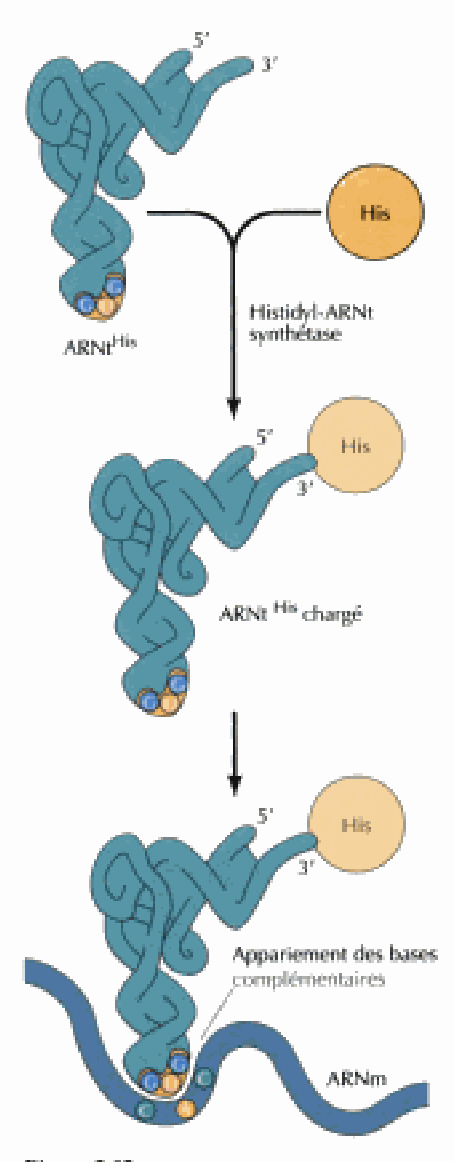


Figure 3.12
Rôle de l'ARN de transfert.
Pendant la synthèse protéique, l'ARN de transfert sert d'adaptateur. Chaque acide aminé (par exemple l'histidine) est greffé au bout 3' d'un ARNt particulier par l'enzyme approprié (une aminoacyl-ARNt synthétase). À cause de la complémentarité d'appariement des bases, l'ARNt chargé va s'aligner ensuite sur la matrice d'ARNm.

L'autre difficulté rencontrée pour expliquer la traduction d'une séquence nucléotidique en séquence d'acides aminés était l'inconnue du **code génétique** : comment l'information contenue dans une séquence combinant quatre nucléotides différents pouvait-elle se muer en une séquence combinant les 20 résidus d'acide aminé d'une protéine ? Comme quatre nucléotides seulement doivent spécifier 20 acides aminés, il faut au moins trois nucléotides pour coder chaque acide aminé. Un à un, les quatre nucléotides ne pourraient coder que quatre acides aminés, par paire, ils pourraient coder seulement seize acides aminés (4^2), mais sous forme de triades (triplets), ils coderont 64 acides aminés différents — plus qu'il n'en faut pour les 20 espèces d'acides aminés qu'on trouve dans les protéines.

On obtint une preuve expérimentale directe du code à triade en étudiant des bactériophages T4 mutés dans un gène très bien connu, appelé *rII*. Ces phages mutés forment des plages anormalement grandes, qu'on distingue facilement des plages formées par les phages de type sauvage, d'où la facilité d'isoler en grand nombre ces phages mutés dans le gène *rII* et d'établir une carte génétique fine de ce locus. L'étude des recombinants entre mutants *rII* issus d'addition ou de délétions de nucléotides révéla que les phages ayant subi une addition ou une délétion d'un ou de deux nucléotides possédaient toujours le phénotype mutant, alors que ceux qui avaient subi une addition ou une délétion de trois nucléotides gardaient souvent la

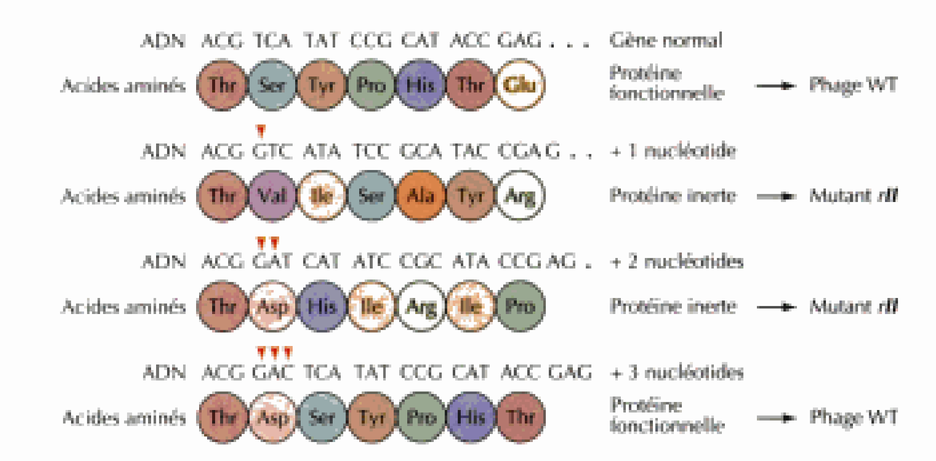


Figure 3.13
Preuve génétique de l'existence d'un code à triades. On examina une série de mutations consistant en l'addition de un, deux ou trois nucléotides dans le gène *rII* du bactériophage T4. L'addition de un ou deux nucléotides modifie le cadre de lecture du reste de la chaîne ; aussi, tous les résidus d'acide aminé suivants sont-ils incorrects et il se forme une protéine inactive, déterminant un phage muté. Par contre, l'addition de trois nucléotides ne fait que modifier un seul acide aminé ; le cadre de lecture du reste de la chaîne polypeptidique est normal et il se forme une protéine active qui confère au phage le caractère sauvage (WT).

fonction de type sauvage (figure 3.13). Ces résultats suggéraient que le gène est lu par groupe de trois nucléotides, à partir d'un point fixe ; ainsi, l'ajout ou le retrait d'un ou deux nucléotides détruirait le cadre de lecture de tout le gène, en codant des acides aminés inappropriés sur toute la longueur de la protéine codée ; par contre, l'ajout ou la perte de trois nucléotides ferait gagner ou perdre un seul acide aminé, le reste de la séquence d'acides aminés restant inchangé, pour donner bien souvent une protéine fonctionnelle.

Le déchiffrage du code génétique consistait donc à assigner une triade nucléotidique à chacun des acides aminés. On le résolut en utilisant un système capable d'effectuer la synthèse protéique *in vitro* (**traduction** *in vitro*). On savait que des extraits cellulaires contenant des ribosomes, des acides aminés, des ARNt et les enzymes nécessaires pour attacher chaque acide [redacted]

Tableau 3.1 Le code génétique

Première position	Deuxième position U	C	A	G	Troisième position
U	Phé	Sér	Tyr	Cys	U
	Phé	Sér	Tyr	Cys	C
	Leu	Sér	Stop	Stop	A
	Leu	Sér	Stop	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Sér	U
	Ile	Thr	Asn	Sér	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Mét	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

quer que d'être transcrit en ARNm, lequel sert à son tour de matrice pour la synthèse des protéines. Comme on l'a indiqué au chapitre 1, le matériau génétique de certains virus n'est pas de l'ADN mais de l'ARN, ce qui fait penser à l'existence d'autres modes de transfert de l'information génétique.

On découvrit d'abord des génomes constitués d'ARN chez les virus végétaux, parmi lesquels beaucoup se composent seulement d'ARN et de protéines. Dans les années '50, on prouva directement que l'ARN de ces virus végétaux leur sert vraiment de matériel génétique, notamment par des expériences montrant que l'ARN pur obtenu du virus de la mosaïque du tabac pouvait infecter de nouvelles cellules hôtes, qui allaient produire une descendance de particules virales infectieuses. On mit ensuite au jour le mode de réplication de la plupart des génomes viraux en étudiant les bactériophages à ARN de *E. coli* ; on montra qu'ils codaient un enzyme singulier, capable de catalyser la synthèse d'un ARN sur une matrice d'ARN (synthèse d'ARN dirigée par un ARN), *via* un mécanisme d'appariement de bases entre brins complémentaires, mécanisme identique à celui mis en jeu dans la réplication d'ADN ou dans la transcription d'ADN en ARN.

Pourtant, une synthèse d'ARN dirigée par un ARN ne rendait pas vraiment compte de la réplication de certains virus animaux (virus tumorigènes à ARN), qui attiraient l'attention par leur pouvoir de provoquer des cancers chez les animaux infectés. Bien que ces virus possédassent de l'ARN génomique dans leur virions, des expériences effectuées par Howard Temin au début des années '60 indiquaient que la réplication de ces virus exige que de l'ADN soit synthétisé dans les cellules infectées ; Temin émit l'hypothèse que les virus tumorigènes à ARN (appelés maintenant **rétrovirus**) se répliquent *via* la synthèse d'un intermédiaire d'ADN, appelé ADN proviral (figure 3.15). La plupart des biologistes reçurent cette idée avec méfiance car elle implique une synthèse d'ADN sur de l'ARN pour matrice–l'opposé du postulat central. Néanmoins, en 1970, Temin et David Baltimore découvrirent de façon indépendante que les virus tumorigènes à ARN possèdent un enzyme inconnu auparavant, qui catalyse la synthèse d'ADN sur une matrice d'ARN ; en outre, on trouva sans conteste des séquences d'ADN viral dans les cellules infectées. On démontrait

EXPÉRIENCE CLÉ



Hypothèse de l'ADN proviral

Nature du provirus du sarcome de Rous

Howard M. Temin
McArdle Laboratory, University of Wisconsin, Madison, WI

National Cancer Institute Monographs, Volume 17, 1964, pages 557-570.

Contexte

Le virus du sarcome de Rous (RSV), premier virus cancérogène connu, attira un intérêt considérable en tant que système expérimental pour étudier la biologie moléculaire du cancer. Dans ce domaine de recherche, Temin, pour sa thèse de licence en 1958, mit au point le premier test de transformation d'une cellule normale en cellule tumorale dans une culture infectée par RSV : pareil test qualitatif *in vitro* pouvait alors servir de base aux futures études de transformation cellulaire et de réplication virale. Aux cours de ces travaux, Temin fit plusieurs découvertes inattendues montrant que la réplication de RSV était fondamentalement différente de celle des autres virus à ARN. Ceci amena Temin à émettre l'hypothèse dite « de l'ADN proviral » : l'ARN viral serait copié en ADN dans la cellule infectée — une idée qui heurtait de front le postulat central adopté par tous les biologistes moléculaires.

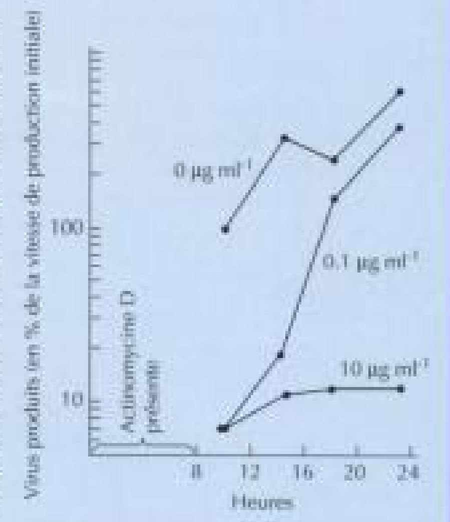
Preuve expérimentale

L'hypothèse de l'ADN proviral se basait sur plusieurs types d'arguments expérimentaux. D'une part, l'étude de la transformation des cellules par divers mutants de RSV montrait que d'importantes caractéristiques des cellules transformées étaient déterminées par l'information génétique portée par le virus ; cette information passait systématiquement aux cellules filles, même en l'absence de réplication virale. Aussi Temin proposa-t-il que le génome viral était présent dans la cellule infectée sous une forme toujours transmise à la descendance, forme qu'il appela provirus.

D'autre part, on prouva que ce provirus était de l'ADN en utilisant des inhibiteurs métaboliques. En choisissant l'actinomycine D, qui inhibe la synthèse d'ARN sur une matrice d'ADN, on remarqua d'abord qu'on arrêtait la production de virions dans la cellule infectée par RSV (voir la figure ci-contre). Ensuite, on montra qu'en inhibant la synthèse d'ADN on bloquait les premières étapes de l'infection de la cellule par RSV. L'ADN semblait donc indispensable au début de l'infection et la synthèse d'ARN sur la matrice d'ADN nécessaire ensuite à la néoformation de particules virales ; on devait en conclure que le provirus était une réplique de l'ARN génomique du virus. Temin chercha des preuves supplémentaires en faveur de son hypothèse, en utilisant l'hybridation des acides nucléiques pour trouver des séquences virales dans l'ADN des cellules infectées, mais la faible sensibilité des méthodes de l'époque ne lui permit pas d'apporter un argument convainquant.

Portée de la découverte

L'hypothèse de l'ADN proviral s'appuyait donc sur des expériences de génétique et d'inhibition métabolique. C'était une proposition révolutionnaire, qui contredisait le postulat central accepté par tous les biologistes moléculaires ; dans ce contexte, l'hypothèse de Temin selon laquelle RSV se répliquait par un transfert d'information de l'ARN à l'ADN fut non seulement rejetée, mais aussi tournée en ridicule par la communauté scientifique.



Influence de l'actinomycine D sur la réplication de RSV. On a cultivé des cellules infectées par RSV en présence des concentrations indiquées d'actinomycine D pendant 8 heures, puis on a éliminé l'actinomycine D et mesuré la quantité de virions produits par les cellules.

ainsi un autre mode de transfert d'information dans les systèmes biologiques, à savoir la synthèse d'ADN sur un ARN, appelée à présent **transcription inverse**.

La transcription inverse est cruciale, non seulement dans la réplication des rétrovirus, mais encore dans au moins deux autres domaines de la biologie moléculaire et cellulaire. D'une part, la transcription inverse n'est pas l'apanage des rétrovirus ; elle existe aussi dans les cellules et est souvent, comme on le montrera au chapitre 5, responsable de transpositions de

Hypothèse de l'ADN proviral (suite)

Durant les années '60, Temin continua à chercher des preuves en faveur de sa théorie. Ses efforts aboutirent en 1970, avec la découverte par Temin et Satoshi Mizutani et indépendamment par David Baltimore d'un enzyme viral, baptisé transcriptase inverse, qui synthétise l'ADN sur une matrice d'ARN–preuve biochimique indiscutable qu'il fallait remettre en question le postulat central.

Temin concluait sa publication de 1970 en notant que ses résultats « confirment bien que l'hypothèse de l'ADN proviral est correcte et que les virus cancérogènes à génome d'ARN possèdent un génome d'ADN quand ils se trouvent dans une cellule et un génome d'ARN quand ils se trouvent sous la forme de virions. Ce résultat devrait influencer profondément les théories de la cancérogenèse virale et même les théories du transfert d'information dans d'autres systèmes biologiques ». Comme l'avait prévu Temin, la découverte de la synthèse d'ADN sur une matrice d'ARN nous a fait comprendre beaucoup mieux le processus de cancérisation, les rétrovirus humains et le réarrangement de gènes. En outre, la transcriptase inverse est devenue un outil merveilleux pour le clonage de l'ADN, propulsant ainsi pratiquement tous les domaines de la biologie moléculaire et de la biologie cellulaire contemporaines.


Howard Temin

Figure 3.15
Transcription inverse et réplication des rétrovirus. Les rétrovirus possèdent un génome à ARN dans leurs virions. Quand un rétrovirus pénètre dans une cellule hôte, c'est cependant un exemplaire ADN de l'ARN viral qui se forme, grâce à la transcriptase inverse. Cet ADN viral s'intègre alors dans l'ADN chromosomique de l'hôte pour constituer un ADN proviral qui sera transcrit en ARN viral destiné à la lignée de virions.

séquences d'ADN d'un site chromosomique à un autre. D'autre part, on se sert, au laboratoire, d'enzymes qui catalysent une synthèse d'ADN sur une matrice d'ARN (**transcriptases inverses**) pour obtenir des copies ADN de n'importe quelle molécule d'ARN. L'usage d'une transcriptase inverse a donc permis d'étudier les ARNm des cellules eucaryotes selon l'approche moléculaire utilisée à présent pour manipuler l'ADN, approche que nous allons exposer.

ADN RECOMBINANT

Il est surprenant de constater à quel point les expériences classiques de biologie moléculaire réussirent à illuminer nos concepts fondamentaux sur la nature et l'expression du gène. Comme ces études reposaient surtout sur des analyses génétiques, leur succès était lié en grande partie au fait que l'on choisissait des organismes simples, faciles à cultiver (comme les bactéries et les virus). On devait pourtant encore prouver que ces concepts de base permettaient de saisir la complexité des eucaryotes au niveau moléculaire, car les génomes de la plupart des eucaryotes (l'Homme, par exemple) sont près de mille fois plus complexes que celui de *E. coli*. Au début des années '70, on n'imaginait pas pouvoir étudier ces génomes au niveau moléculaire, notamment parce qu'il n'existait aucun moyen d'isoler un gène donné et de l'étudier.

Cet obstacle au développement de la biologie moléculaire tomba lorsqu'on mit au point la technologie de l'ADN recombinant, qui permettait aux chercheurs d'isoler, de séquencer et de manipuler le premier gène venu appartenant à n'importe quel type de cellule. En appliquant la technologie de l'ADN recombinant, on arrivait donc à étudier à l'échelle moléculaire la structure et la fonction des gènes d'eucaryotes, une révolution dans notre saisie de la biologie cellulaire.

Endonucléases de restriction

La technologie de l'ADN recombinant est née de la caractérisation des **endonucléases de restriction**, enzymes qui coupent la molécule d'ADN au sein de séquences singulières. On trouva ces enzymes chez les bactéries, où elles servent de défense contre l'intrusion d'ADN étranger (par exemple, viral). Les bactéries possèdent tout un lot d'endonucléases de restriction, qui clivent l'ADN en plus de cent sites de reconnaissance particuliers, consistant chacun en une séquence singulière de quatre à huit paires de bases (voir tableau 3.2).

Puisqu'une endonucléase de restriction coupe l'ADN au milieu d'une séquence particulière, on s'en sert pour tronçonner une molécule d'ADN donnée en des sites choisis d'avance. Ainsi, l'endonucléase de restriction *Eco*RI reconnaît la séquence des six bases appariées GAATTC. On retrouve cette séquence en cinq endroits différents de l'ADN du bactériophage λ ; cet

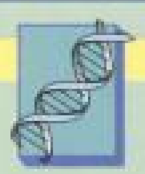
Tableau 3.2 Sites de reconnaissance d'endonucléases de restriction classiques

Enzyme[a]	Origine	Site reconnu[b]
*Bam*HI	*Bacillus amyloliquefaciens* H	GGATCC
*Eco*RI	*Escherichia coli* RY13	GAATTC
*Hae*III	*Haemophilus aegyptius*	GGCC
*Hin*dIII	*Haemophilus influenzae* Rd	AAGCTT
*Hpa*I	*Haemophilus parainfluenzae*	GTTAAC
*Hpa*II	*Haemophilus parainfluenzae*	CCGG
*Mbo*I	*Moraxella bovis*	GATC
*Not*I	*Nocardia otitidis-caviarum*	GCGGCCGC
*Sfi*I	*Streptomyces fimbriatus*	GGCCNNNNNGGCC
*Taq*I	*Thermus aquaticus*	TCGA

[a] Les noms dérivent de l'espèce productrice, suivis d'un numéro correspondant aux divers enzymes isolés d'un même organisme (par exemple, *Hpa*I et *Hpa*II)

[b] Le site reconnu montre la séquence d'un seul brin de l'ADN bicaténaire. N représente n'importe quelle base.

MÉDECINE MOLÉCULAIRE



VIH et SIDA

Pathogénie

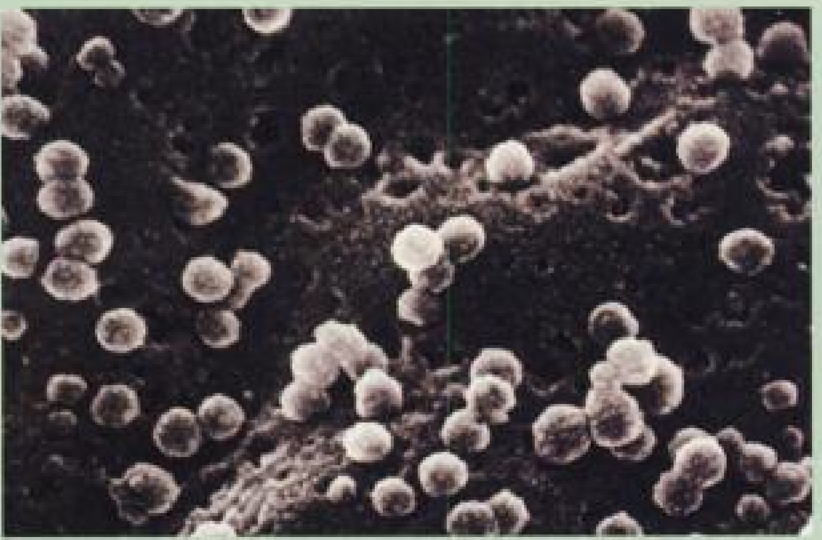
Le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) est une maladie nouvellement apparue et décrite en 1981. C'est à présent une vraie pandémie, avec plus de 4 millions de cas ayant atteint le stade SIDA. Rien qu'aux USA, on en connaît plus de 500 000 cas et le SIDA est devenu une cause majeure de décès chez les hommes âgés de 25 à 44 ans. Les symptômes cliniques du SIDA résultent surtout de la défaillance du système immunitaire. En l'absence de défense immunitaire normale, ces patients sont sensibles à des infections opportunistes causées par des agents (virus, bactéries, champignons et protozoaires) auxquels les individus sains résistent d'habitude fort bien. Les victimes du SIDA développent souvent aussi certains types de cancer, notamment des lymphomes et sarcomes de Kaposi, bien que la plupart des décès soient dus aux infections opportunistes.

Bases moléculaire et cellulaire

Le SIDA est dû à un rétrovirus (le virus de l'immunodéficience humaine, VIH) découvert par Robert Gallo et Luc Montagnier en 1983. VIH infecte principalement un type particulier de lymphocyte (T4) nécessaire à une réponse immunitaire efficace. Contrairement à la plupart des rétrovirus, comme le virus du sarcome de Rous, VIH ne rend pas la cellule qu'il infecte cancéreuse, mais la tue après s'y être répliqué, au point de réduire tellement la population de cellules T4 que le système immunitaire des individus infectés est défaillant ; d'où les infections opportunistes et les cancers observés chez les sidéens.

Prévention et traitement

Le seul moyen connu d'éviter le SIDA est de se prémunir contre l'infection par VIH. VIH est un virus fragile, qui perd vite son activité en dehors de l'organisme ; aussi ne se transmet-il pas par un contact fortuit avec une personne infectée. Il se transmet de trois façons, à savoir par contact sexuel, par contamination avec des dérivés sanguins et de la mère à l'enfant pendant la grossesse ou l'allaitement. Depuis qu'on a isolé le virus VIH, on a mis au point des tests pour vérifier l'innocuité des facteurs de coagulation et des pochettes de sang et de ses dérivés utilisés pour la transfusion. Pour prévenir le SIDA causé par les autres voies d'infection, les gens doivent ne prendre aucun risque, autrement dit respecter de saines règles de comportement sexuel et éviter de se contaminer avec des produits salis par du sang, tel que seringues à usage partagé en vue d'injection intraveineuse de drogues. Si améliorer le comportement individuel permet de réduire le risque d'infection par VIH, le fait d'avoir identifié ce virus comme cause du SIDA nous fait espérer la venue de moyens de prévention et de traitement. Les chercheurs tentent obstinément de mettre au point un vaccin, même si le virus VIH paraît insaisissable par cette voie. Cependant, les patients infectés peuvent espérer beaucoup des substances qui inhibent la réplication virale, par exemple, l'azidothymidine (AZT), utilisée depuis 1987. Son action s'explique par sa spécificité envers la transcriptase inverse de VIH, qui incorpore l'AZT à la place de la thymidine et, ce faisant, inactive l'ADN du provirus VIH. Comme l'ADN polymérase cellulaire utilise l'AZT à un degré bien moindre qu'elle n'utilise la thymidine, cette substance agit comme un inhibiteur sélectif de la réplication de VIH ; malheureusement, si un traitement par l'AZT améliore nettement les individus infectés, il n'arrive pas à les guérir. C'est pourquoi, les laboratoires cherchent d'autres médicaments plus puissants ou de meilleures combinaisons de médicaments dirigés contre la transcriptase inverse ou contre d'autres protéines du virus VIH.



Micrographie électronique à balayage montrant des virions VIH bourgeonnant à la surface d'un lymphocyte T (Cecil Fox / Photo Researchers, Inc)

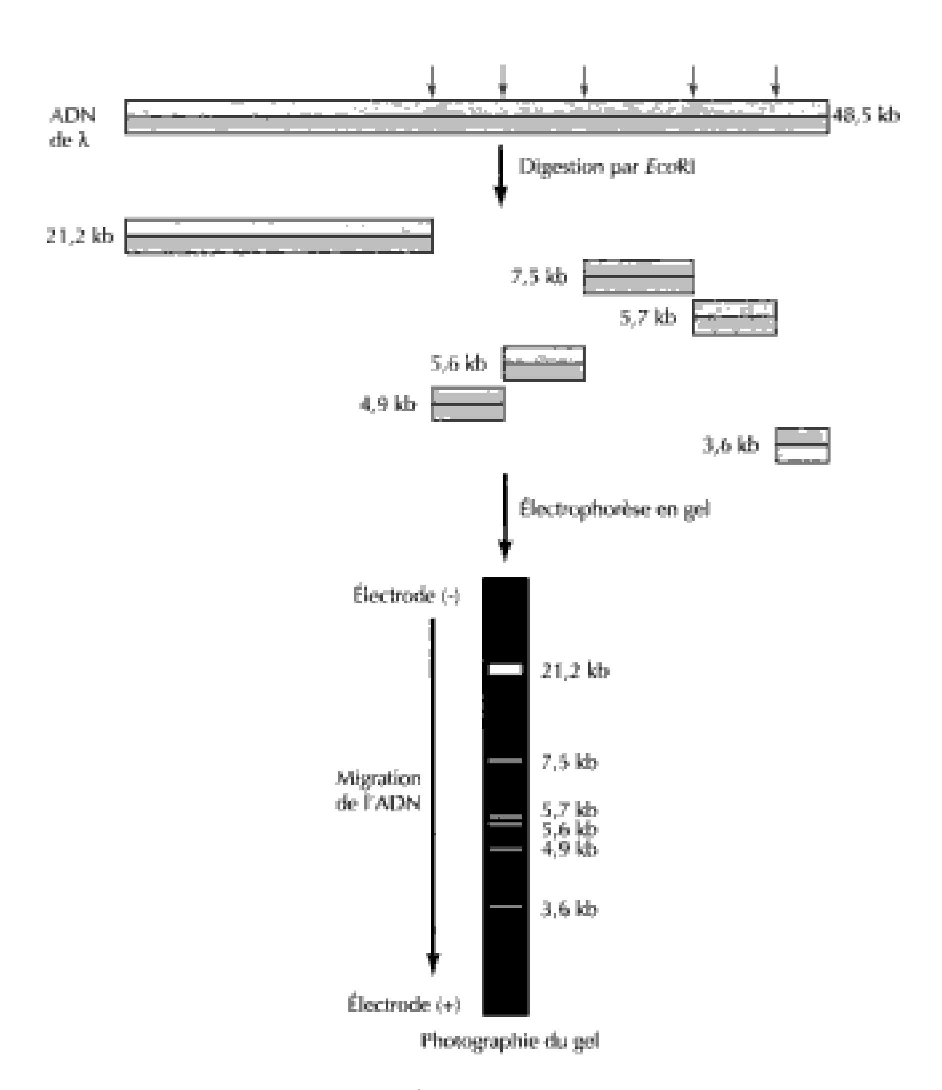


Figure 3.16
Digestion de λ par *Eco*RI et électrophorèse des fragments obtenus. L'enzyme *Eco*RI découpe l'ADN du phage λ en cinq endroits (flèches), en donnant six fragments d'ADN, qu'on sépare par électrophorèse en gel d'agarose. Au sein du gel, ces fragments migrent vers l'électrode positive, les plus petits le plus rapidement. À la fin de l'électrophorèse, on colore l'ADN par une substance fluorescente et on photographie le gel. On a indiqué la taille des fragments obtenus.

enzyme digère donc l'ADN de λ en donnant six fragments longs de 3,6 à 21,2 kilobases (1 kilobase, ou kb, = 1 000 paires de bases)(figure 3.16). On sait séparer ces fragments les uns des autres selon leur taille par **électrophorèse en gel**, méthode courante dans laquelle les molécules se séparent selon leur vitesse de migration dans un champ électrique. Le gel, constitué d'habitude d'agarose ou de polyacrylamide, sépare deux solutions tampons dans lesquelles trempent les électrodes ; on pipette l'échantillon (par exemple, un mélange de molécules d'ADN à résoudre en ses composants) dans une fente préformée dans le gel et on applique une différence de potentiel à travers le gel. Comme les acides nucléiques portent des charges négatives (à cause des phosphates du squelette), ils migrent vers l'électrode positive. Le gel sert de crible et retarde sélectivement le déplacement des molécules selon leur taille, les plus petites migrant le plus vite, de sorte qu'on sépare ainsi les unes des autres les molécules d'ADN d'un mélange hétérogène selon la longueur des molécules.

Outre leur taille, l'ordre dans lequel se suivent les fragments de restriction dans une molécule peut être trouvé par plusieurs méthodes, par exemple pour l'ADN de λ, la place des sites de restriction *Eco*RI. La place de tels sites pour quelques endonucléases de restriction fournira une **carte de restriction** détaillée d'une molécule d'ADN donnée, par exemple d'un génome viral (figure 3.17). En outre, une électrophorèse en gel permet alors d'isoler chaque fragment d'ADN produit par une endonucléase de restriction, puis de le séquencer. Ce fut la méthode employée pour caractériser l'ADN de nombreux virus.

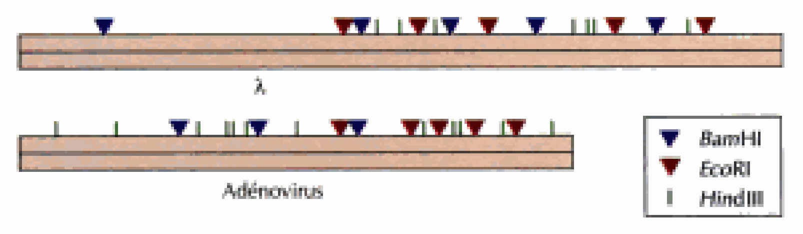


Figure 3.17
Carte de restriction des ADN de λ et d'un adénovirus. On a indiqué la place des sites de coupure par *Bam*HI, *Eco*RI et *Hin*DIII sur l'ADN du bactériophage λ de *E. coli* (48,5 kb) et sur l'ADN de l'adénovirus 2 humain (35,9 kb).

Une digestion par les endonucléases de restriction ne suffit cependant pas à résoudre assez finement l'agencement de plus grandes molécules d'ADN, comme celles des génomes cellulaires. Une endonucléase de restriction qui reconnaît un site de six paires de bases (telle *Eco*RI) coupe statistiquement l'ADN toutes les 4 096 paires de bases ($1/4^6$). Une molécule de la taille de l'ADN de λ (48,5 kb) donnerait ainsi environ dix fragments *Eco*RI, en accord avec le résultat de la figure 3.16. Il en va pourtant tout autrement quand on digère des génomes de plus grande taille par les endonucléases de restriction : ainsi, le génome humain, long d'environ 3×10^6 kb donnerait plus de 500 000 fragments *Eco*RI. Il est impossible d'en séparer les composants, comme le montre l'électrophorèse en gel d'agarose : au lieu d'un profil de bandes bien séparées, on n'obtient qu'une traînée d'ADN continue. Comme on n'arrive pas à en isoler un fragment de restriction déterminé, la digestion par ces enzymes ne fournit pas à elle seule une source homogène d'ADN pour des études futures. Cependant, on produira des fragments d'ADN en quantité suffisante si on recourt au clonage moléculaire.

Construction de molécules d'ADN recombinant

Le nœud du **clonage moléculaire** est d'insérer le fragment d'ADN auquel on s'intéresse (par exemple, un morceau d'ADN humain) dans une molécule d'ADN (un **vecteur**) capable de se répliquer de façon indépendante dans une cellule hôte. On obtient alors une **molécule recombinée** ou **clone moléculaire**, formé de l'insert d'ADN emprisonné dans la séquence de l'ADN vecteur. On obtiendra l'insert d'ADN en grande quantité si on choisit l'hôte approprié pour répliquer la molécule recombinante. On peut par exemple cloner des fragments d'ADN humain dans des vecteurs dérivés du bactériophage λ (figure 3.18) ; une fois introduites dans *E. coli*, ces molécules recombinantes se multiplient efficacement pour donner des millions de jeunes phages portant un insert d'ADN humain. On extrait facilement cet ADN du phage et on obtient une grande quantité de molécules recombinantes contenant toutes un fragment unique d'ADN humain. Même si ce fragment ne représente qu'un cent millième de l'ADN génomique humain, il représente environ, après clonage, un dixième de l'ADN du phage λ. En outre, en traitant ce dernier par une endonucléase de restriction, qui sépare l'insert du reste du vecteur, et en fractionnant le mélange de fragments par une électrophorèse en gel, on récupère une quantité du fragment d'ADN humain suffisante pour effectuer des examens et des manipulations ultérieures.

Les fragments d'ADN servant à produire des molécules recombinées proviennent d'une digestion par des endonucléases de restriction. Souvent, ces enzymes coupent la séquence reconnue en des sites décalés sur chaque brin, pour donner des queues monocaténaires débordantes, dites aussi à

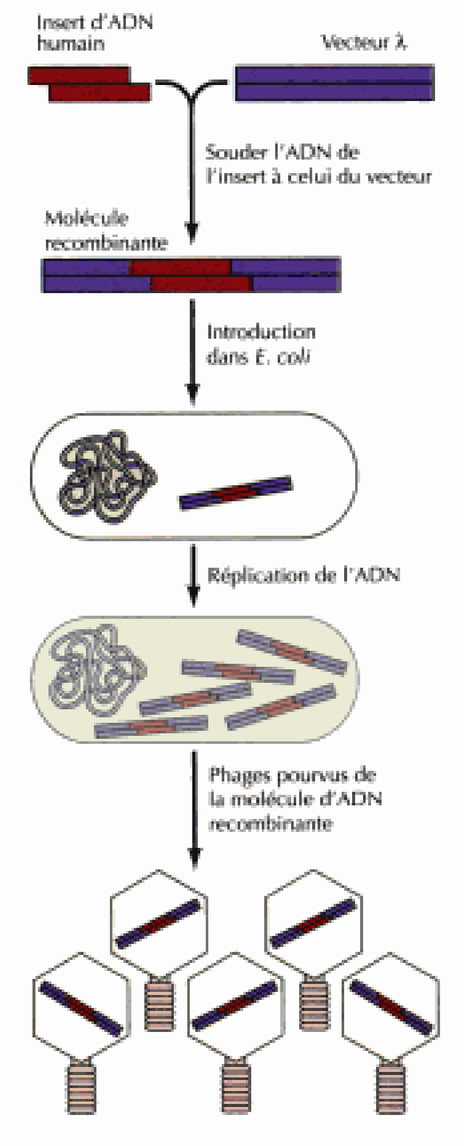
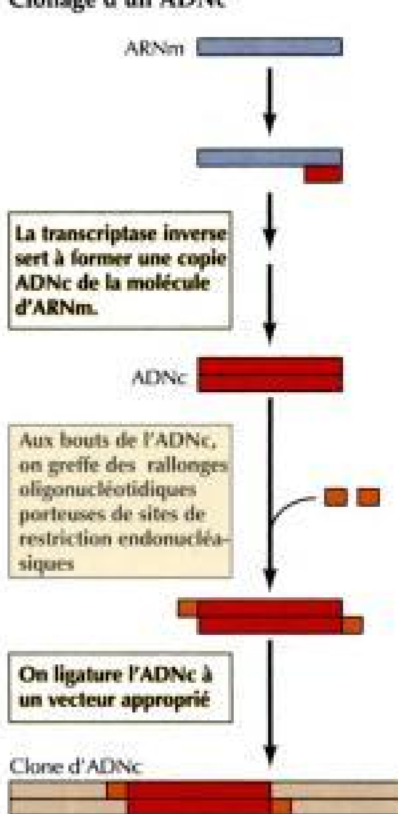


Figure 3.18
Production d'une molécule d'ADN recombinante. On insère un fragment d'ADN humain dans un vecteur construit à partir de l'ADN de λ. On introduit ensuite la molécule recombinée dans des cellules de *E. coli*, où le phage λ se réplique pour donner une population portant l'insert d'ADN humain.

Figure 3.19
Soudure de molécules d'ADN.
On digère l'ADN du vecteur et celui de l'insert avec une endonucléase de restriction (telle *Eco*RI) qui coupe les deux brins en des sites décalés pour donner des queues monocaténaires (bouts collants). Une fois les molécules de vecteur et d'insert associées par complémentarité des paires de bases, on joint les brins d'ADN par covalence à l'aide d'une ADN ligase, pour obtenir une molécule recombinée.

Insert d'ADN
ADN vecteur
*Eco*RI
Clivage par *Eco*RI
Le clivage par EcoRI donne des bouts mono-caténaires débordants
Appariement des bases complémentaires
Soudure par l'ADN ligase
Molécule recombinée

Figure 3.20
Clonage d'un ADNc



bouts collants, qui s'associent les unes aux autres par complémentarité de bases (figure 3.19). On rend définitive cette association en traitant la préparation par une **ADN ligase**, un enzyme qui scelle les coupures présentes dans les brins d'ADN (voir chapitre 5). On obtient donc une molécule d'ADN recombinée en soudant ainsi deux fragments d'ADN (par exemple, un insert d'ADN humain et un vecteur ADN obtenu de λ) préparés par digestion avec une même endonucléase de restriction.

Les fragments d'ADN clonables ne sont pas seulement ceux qui se terminent par des sites d'endonucléases de restriction ; aux bouts francs de n'importe quel fragment d'ADN, on peut en effet greffer des rallonges (*linkers*) portant des sites reconnus chacun par diverses endonucléases de restriction ; ces rallonges à sites polyvalents sont de petits polynucléotides de synthèse qui permettent de modeler pratiquement n'importe quel fragment d'ADN pour le lier à un vecteur.

On clone non seulement des séquences d'ADN, mais aussi des séquences d'ARN (figure 3.20). Grâce à une transcriptase inverse, on commence par recopier l'ARN en ADN, pour former un **ADNc**, ainsi nommé parce qu'il est complémentaire de l'ARN utilisé comme matrice, qu'on ligature à un ADN vecteur comme décrit ci-dessus. Comme les gènes d'eucaryotes sont souvent interrompus par des séquences intercalaires (introns, voir chapitre 4), éliminées de l'ARNm par excision, le pouvoir de cloner un

ADNc en plus de l'ADN génomique correspondant fut crucial pour saisir la structure et la fonction d'un gène.

Vecteurs utilisés pour recombiner des ADN

Selon la taille de l'insert d'ADN et le but recherché, on choisira, pour recombiner des molécules d'ADN, le type convenable de vecteur de clonage. Voyons les principaux types de vecteur disponibles pour isoler un ADN cloné et en obtenir de multiples copies. Plus avant, nous traiterons d'autres vecteurs mis au point pour exprimer des ADN clonés et pour introduire les molécules recombinantes dans la cellule eucaryote.

Les vecteurs issus du bactériophage λ servent souvent à isoler pour la première fois, d'une cellule eucaryote, soit un clone d'ADN génomique, soit un clone d'ADNc (figure 3.21). Dans les vecteurs issus de λ, on a échangé les séquences génomiques du bactériophage qui ne sont pas nécessaires à la réplication contre des sites de restriction singuliers adaptés à l'insertion de l'ADN à cloner. Même avec une taille d'insert d'ADN de 15 kb, on construit un génome recombinant qui peut être empaqueté en particules de phage. Ainsi, pour isoler des clones génomiques d'ADN humain, on lie aux bras d'un vecteur λ des fragments quelconques d'ADN humain d'une taille moyenne de 15 kb. Pour emballer alors facilement ces molécules d'ADN recombinées dans des particules de phage, on ajoute *in vitro* des protéines de λ (appelées extrait d'encapsidation) au mélange de molécules d'ADN ; ces particules de phage servent ensuite à infecter des cultures de *E. coli*. Comme chaque phage recombinant y forme une seule plage d'infection, on

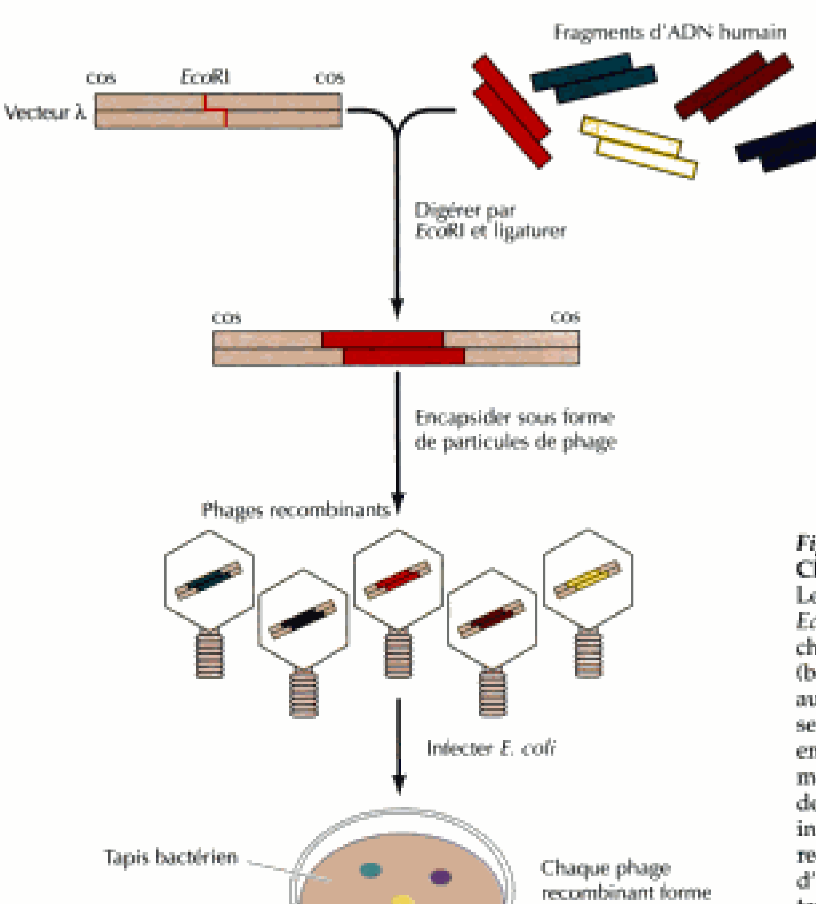


Figure 3.21
Clonage dans un bactériophage λ vecteur.
Le vecteur porte un site de restriction (par exemple *EcoRI*) apte à recevoir l'ADN cloné. En outre, chaque bout du vecteur comporte les sites cos (bouts collants) nécessaires pour encapsider l'ADN au sein des particules de phage. On ligature l'insert d'ADN (humain, par exemple) au vecteur et, en présence de protéines du phage, on laisse les molécules recombinantes s'encapsider sous forme de particules de phage. Ces phages servent alors à infecter une culture de *E. coli*. Chaque phage recombinant, porteur d'un insert particulier d'ADN cloné, produit une plage unique sur le tapis de bactéries. Il reste alors à y prélever un échantillon de la population de phages recombinants qui possèdent un insert d'ADN singulier et à multiplier ce phage à volonté.

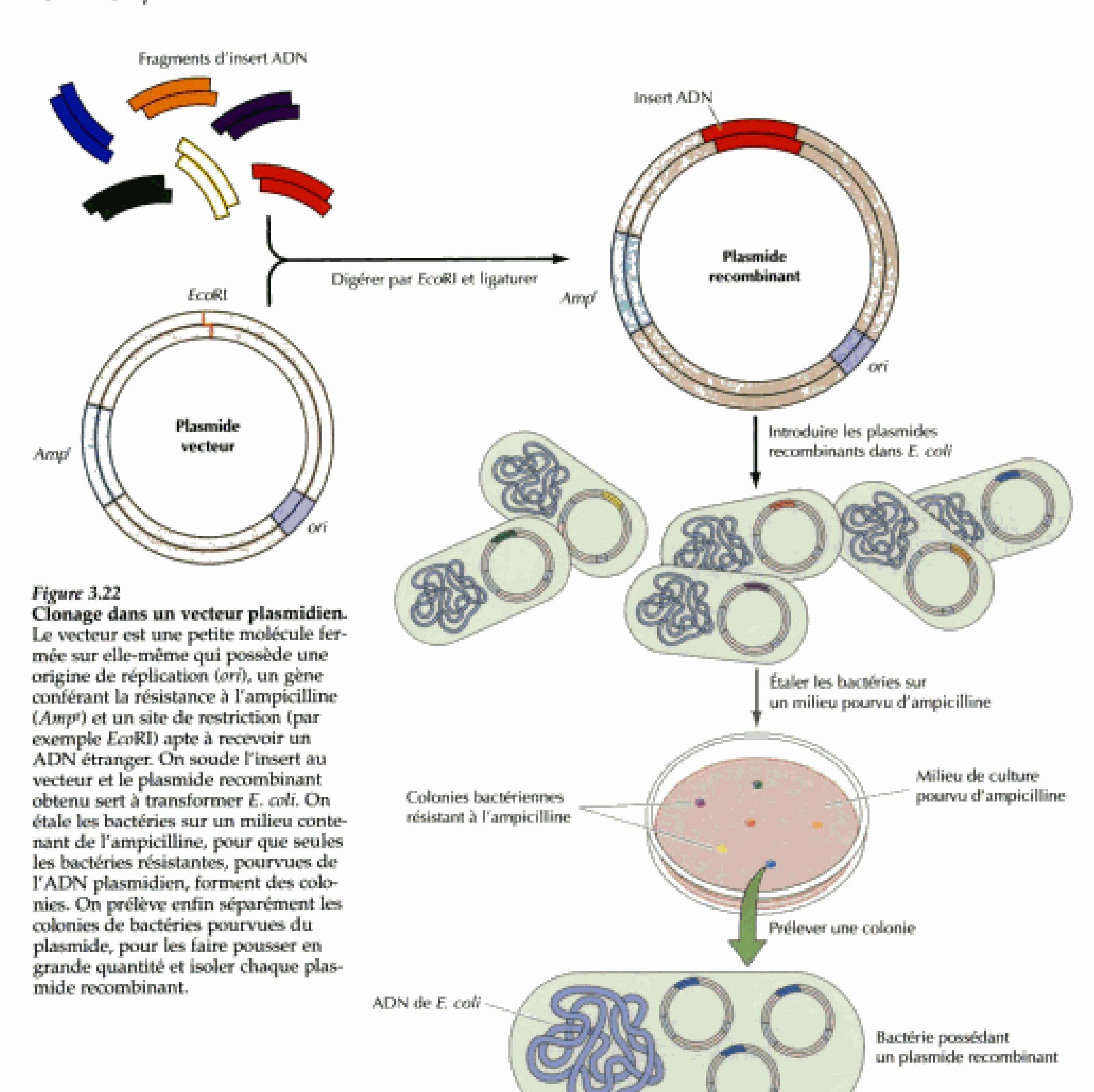


Figure 3.22
Clonage dans un vecteur plasmidien. Le vecteur est une petite molécule fermée sur elle-même qui possède une origine de réplication (*ori*), un gène conférant la résistance à l'ampicilline (*Amp*ʳ) et un site de restriction (par exemple *Eco*RI) apte à recevoir un ADN étranger. On soude l'insert au vecteur et le plasmide recombinant obtenu sert à transformer *E. coli*. On étale les bactéries sur un milieu contenant de l'ampicilline, pour que seules les bactéries résistantes, pourvues de l'ADN plasmidien, forment des colonies. On prélève enfin séparément les colonies de bactéries pourvues du plasmide, pour les faire pousser en grande quantité et isoler chaque plasmide recombinant.

obtient, en la prélevant, une colonie recombinante possédant un insert unique d'ADN humain ; par hybridation d'acides nucléiques ou par d'autres méthodes de criblage décrites dans la section suivante, on arrive alors à identifier le phage recombinant porteur du gène auquel on s'intéresse.

Il est plus facile de manipuler des séquences d'ADN clonées si on dispose de **plasmides** vecteurs au lieu de phages vecteurs (figure 3.22). Un plasmide est une petite molécule d'ADN fermée sur elle-même et capable de se répliquer de façon indépendante dans une bactérie — sans association aucune avec l'ADN chromosomique. L'ADN du plasmide doit seulement porter, d'une part, une **origine de réplication**, c'est-à-dire la séquence d'ADN qui

commande à l'ADN polymérase cellulaire de répliquer la molécule d'ADN en question et, d'autre part, des gènes qui confèrent la résistance à certains antibiotiques (par exemple, à l'ampicilline), de façon à ce qu'on puisse sélectionner la bactérie qui porte ce plasmide. Un vecteur plasmidien ne comprend habituellement que 2 à 4 kb d'ADN, contre les 30 à 45 kb d'ADN de phage présents dans un vecteur λ, ce qui facilite l'examen du fragment d'ADN inséré.

Quand on veut cloner un fragment d'insert d'ADN dans un vecteur plasmidien, on le soude à un site de restriction approprié du vecteur et on se sert de cette molécule recombinée pour transformer *E. coli* ; on sélectionne ainsi les colonies pourvues du plasmide, qui résistent à l'antibiotique introduit dans le milieu de culture. On cultive ensuite en grand ces bactéries pourvues du plasmide et on en extrait l'ADN ; celui-ci se trouve sous forme de petites molécules fermées sur elles-mêmes, présentes à plusieurs centaines d'exemplaires par cellule et que l'on sépare aisément de l'ADN chromosomique bactérien. L'ADN plasmidien ainsi obtenu à l'état pur sert de base à l'examen de l'insert cloné.

Dans certaines études impliquant l'examen d'un ADN génomique, on doit cloner des fragments d'ADN encore plus longs que ceux qui s'adaptent aux vecteurs λ ; on se tourne alors vers les **cosmides** et les **chromosomes artificiels de levure (YAC)**. Les vecteurs cosmidiens (figure 3.23) acceptent des inserts d'environ 45 kb ; ils portent les séquences du bactériophage λ qui servent à encapsider efficacement l'ADN cloné et à former des particules de phage. Puisqu'un cosmide possède aussi, comme les plasmides, une origine de réplication et des gènes de résistance aux antibiotiques, il se réplique dans les cellules bactériennes comme un plasmide. De plus grands fragments d'ADN (de centaines de kb) sont acceptés par les vecteurs YAC, qui se répliquent comme des chromosomes de levure. Au chapitre 4, on verra que ces vecteurs sont particulièrement utiles pour construire la carte d'un chromosome.

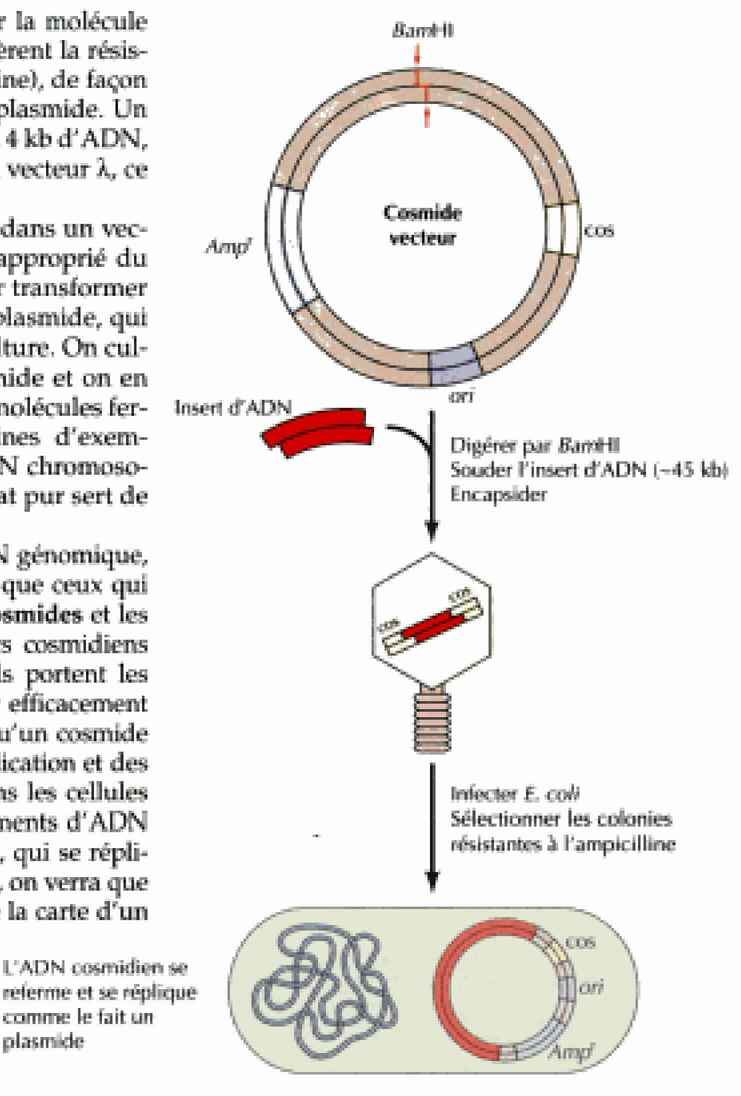


Figure 3.23
Clonage en vecteur cosmidien.
Un cosmide est un plasmide portant des sites cos, qui font que l'ADN s'encapside pour former des particules de phage. À un site de clonage (par exemple, *Bam*HI), on ligature un grand fragment d'insert d'ADN (près de 45 kb) et on obtient une molécule d'une taille voisine de celle du génome de λ (48,5 kb), prête à être encapsidée en formant une particule virale. On pratique comme suit : on ouvre la molécule recombinante, de sorte qu'un site cos se présente à chaque bout de la molécule, on l'encapside pour en faire une particule de phage qui sert à infecter *E. coli*. L'ADN cosmidien se referme sur lui-même dans la bactérie infectée, en formant des molécules qui se répliquent sous forme de plasmides et rendent les cellules résistantes à l'ampicilline.

Séquençage d'un ADN

Le clonage moléculaire permet d'isoler tel ou tel fragment d'ADN en quantité suffisante pour le caractériser en profondeur, notamment pour le séquencer. En trouvant la séquence nucléotidique de nombreux gènes, on a élucidé non seulement la structure de leur produit, les protéines, mais aussi les propriétés des séquences d'ADN qui commandent l'expression des gènes. De plus, les séquences codantes de beaucoup de gènes étant souvent apparentées à celles de gènes déjà connus, on peut souvent prédire correctement la fonction d'un nouveau gène en se basant sur des similitudes de séquence.

Pour séquencer un ADN, il existe deux méthodes principales, qui donnent toutes deux rapidement des informations précises sur la séquence. C'est routine pour la plupart des laboratoires de biologie moléculaire que de déterminer la séquence d'un ADN de plusieurs milliers de bases, au point qu'il est à présent plus facile de cloner et de séquencer un ADN que de trouver la séquence des acides aminés qui composent la protéine correspondante. Comme la séquence nucléotidique d'un gène se traduit facilement en séquence d'acides aminés de la protéine codée, la façon la plus simple de connaître la séquence d'une protéine est de cloner et de séquencer son gène.

La méthode de **séquençage selon Maxam et Gilbert** se base sur une dégradation chimique de l'ADN (figure 3.24). On marque par un radio-isotope le bout du tronçon d'ADN à séquencer ; on traite ensuite des échantillons de cet ADN par des réactifs chimiques qui coupent la molécule

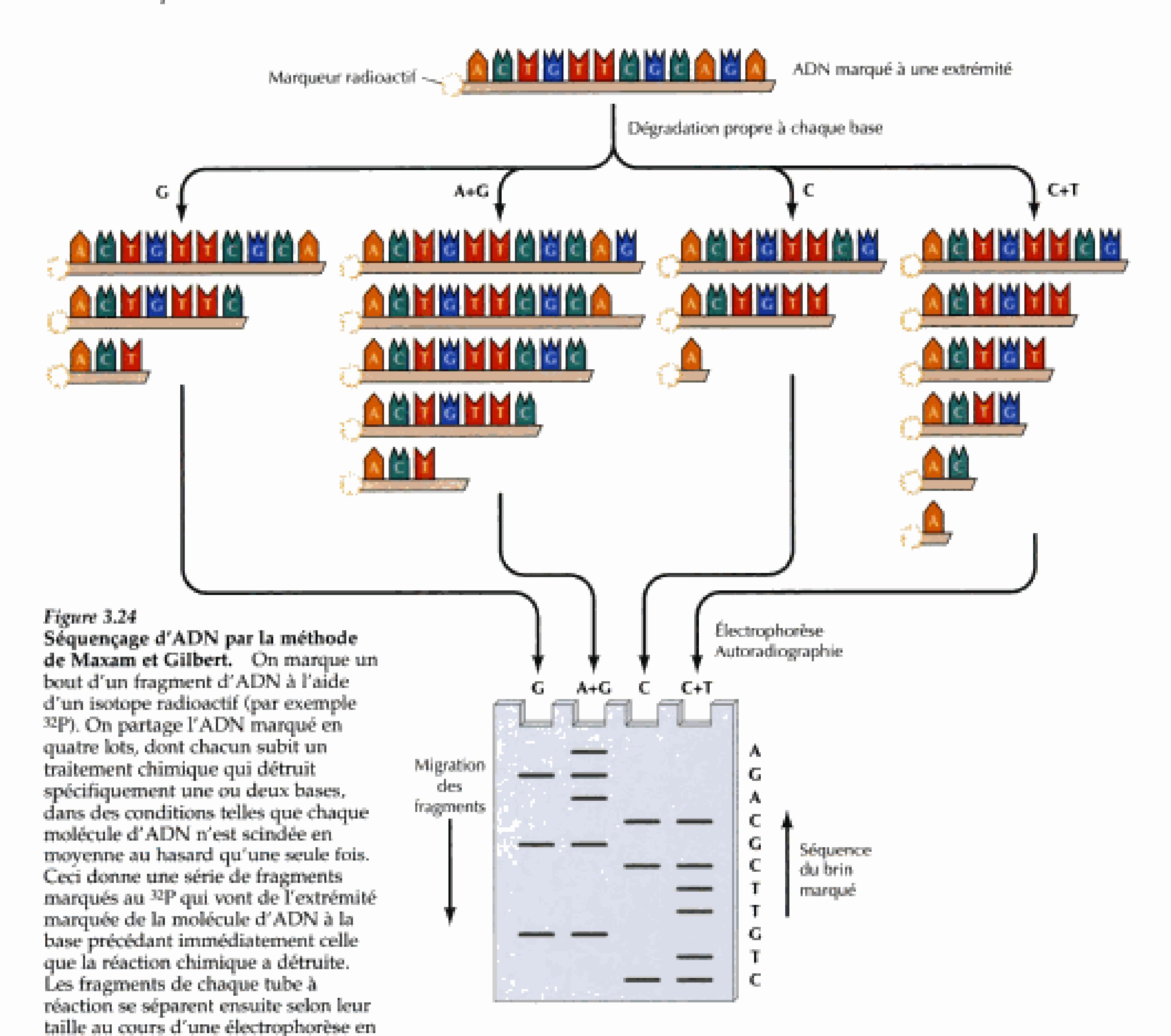


Figure 3.24
Séquençage d'ADN par la méthode de Maxam et Gilbert. On marque un bout d'un fragment d'ADN à l'aide d'un isotope radioactif (par exemple ^{32}P). On partage l'ADN marqué en quatre lots, dont chacun subit un traitement chimique qui détruit spécifiquement une ou deux bases, dans des conditions telles que chaque molécule d'ADN n'est scindée en moyenne au hasard qu'une seule fois. Ceci donne une série de fragments marqués au ^{32}P qui vont de l'extrémité marquée de la molécule d'ADN à la base précédant immédiatement celle que la réaction chimique a détruite. Les fragments de chaque tube à réaction se séparent ensuite selon leur taille au cours d'une électrophorèse en gel. On détecte les fragments radioactifs par autoradiographie et on lit directement la séquence nucléotidique d'après l'ordre dans lequel les fragments apparaissent sur l'autoradiographie. Notez que le nucléotide terminal (ici, A), détruit dans la réaction de dégradation, reste inconnu.

d'ADN en des endroits bien précis, dans des conditions telles que chaque molécule d'ADN ne soit coupée qu'en un ou quelques endroits. Pour ce faire, on effectue quatre réactions séparées, avec des réactifs qui coupent respectivement l'ADN au niveau de G, A + G, C et C + T. Par électrophorèse en gel, on sépare les produits de ces réactions de clivage selon la taille et on retrouve ceux qui sont radioactifs en appliquant sur le gel un film sensible aux radiations (**autoradiographie**). Comme chaque fragment radioactif se termine juste avant la base spécifiquement détruite par le réactif avec lequel on a traité l'échantillon, la séquence nucléotidique correspond à l'ordre dans lequel on lit les fragments sur le gel.

Le **séquençage selon Sanger**, la méthode la plus couramment employée, se base sur le fait qu'une synthèse d'ADN se termine prématurément quand l'ADN polymérase travaille en présence de **didésoxynucléotides** terminateurs (ils sont dépourvus de groupe hydroxyle 3'OH)(figure 3.25). L'enzyme démarre la synthèse à partir d'une amorce radioactive ; on effectue quatre réactions, chacune avec un des didésoxynucléotides (A, C, G ou T) en plus du désoxynucléotide normal. Dès qu'un didésoxynucléotide

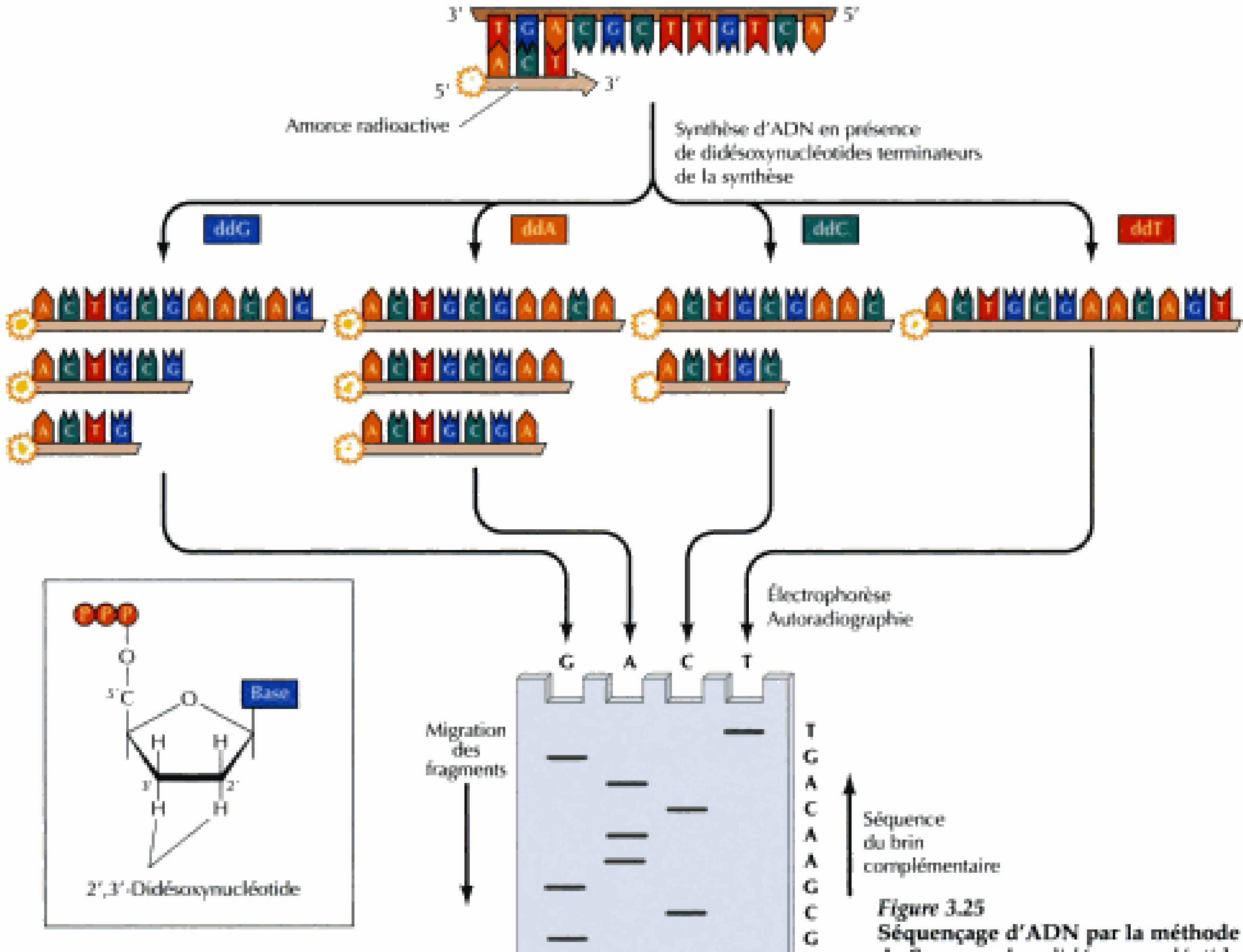


Figure 3.25
Séquençage d'ADN par la méthode de Sanger. Les didésoxynucléotides, dépourvus de groupe hydroxyle, non seulement en 3', mais aussi en 2', servent à interrompre la synthèse d'ADN en des endroits particuliers ; ces molécules s'incorporent normalement dans les brins d'ADN naissants, mais comme elles sont dépourvues de groupe OH 3', elles refusent d'accepter le nucléotide suivant et la synthèse de la chaîne s'arrête. En pratique, on démarre la synthèse d'ADN sur une amorce radioactive. On effectue quatre réactions symétriques, chacune en présence d'un type de didésoxynucléotide mélangé à son analogue normal et aux trois autres nucléotides habituels. Dès qu'un didésoxynucléotide s'incorpore à un brin, la synthèse s'arrête : chaque milieu de réaction contient donc une série de produits allant du premier nucléotide radioactif à la base substituée par un didésoxynucléotide. Une électrophorèse sépare les chaînes formées et on effectue une autoradiographie pour les retrouver ; leur ordre permet de lire la séquence.

s'incorpore, la synthèse d'ADN sur ce brin s'arrête, car il n'existe pas de groupe hydroxyle 3' pour accepter le nucléotide suivant. On produit donc une série de molécules d'ADN marquées, chacune terminée par la base représentée par le didésoxynucléotide de chaque réaction. Comme dans la méthode de Maxam et Gilbert, on fractionne les produits des réactions par une électrophorèse en gel et on trouve la séquence d'après l'ordre des fragments.

Expression de gènes clonés

Outre qu'il permet de trouver la séquence d'un gène cloné, et par conséquent celle des acides aminés de la protéine correspondante, le clonage moléculaire a ouvert la voie à la production de protéines en quantité telle qu'on peut en caractériser la structure et la fonction. Comme beaucoup de protéines intéressantes sont présentes à des taux infimes dans la cellule eucaryote, il est impossible d'en purifier des quantités significatives par les méthodes biochimiques classiques. Une fois un gène cloné, on peut néanmoins vaincre cette difficulté en construisant des vecteurs qui laissent le gène s'exprimer à grande vitesse dans une bactérie ou une cellule eucaryote.

Pour exprimer un gène d'eucaryote chez *E. coli*, on clone son ADNc dans un vecteur plasmidien ou phagique (appelé **vecteur d'expression**) portant des séquences qui commandent à la cellule bactérienne de transcrire et tra-

duire le gène inséré (figure 3.26). Il arrive que certains gènes insérés soient exprimés à un niveau tel que la protéine codée par le gène compte pour près de 10 % des protéines bactériennes ; il est alors assez facile d'obtenir la protéine codée à l'état pur en quantité suffisante pour des études structurales et biochimiques.

Il est souvent préférable de faire s'exprimer un gène cloné à taux élevé dans une cellule eucaryote plutôt que dans une bactérie. Le mode d'expression est critique, notamment si on veut que les modifications posttranscriptionnelles de la protéine (par exemple l'addition de glucides ou de lipides) se passent normalement. On y arrive dans des cellules d'eucaryotes, quand, comme chez *E. coli*, on insère le gène cloné dans un vecteur (habituellement dérivé d'un virus) qui fait s'exprimer le gène à grande vitesse ; souvent, pour exprimer une protéine dans une cellule eucaryote, on infecte des cellules d'insectes avec un **baculovirus** vecteur, qui force les gènes insérés à la place des gènes viraux de structure à s'exprimer à taux très élevé.

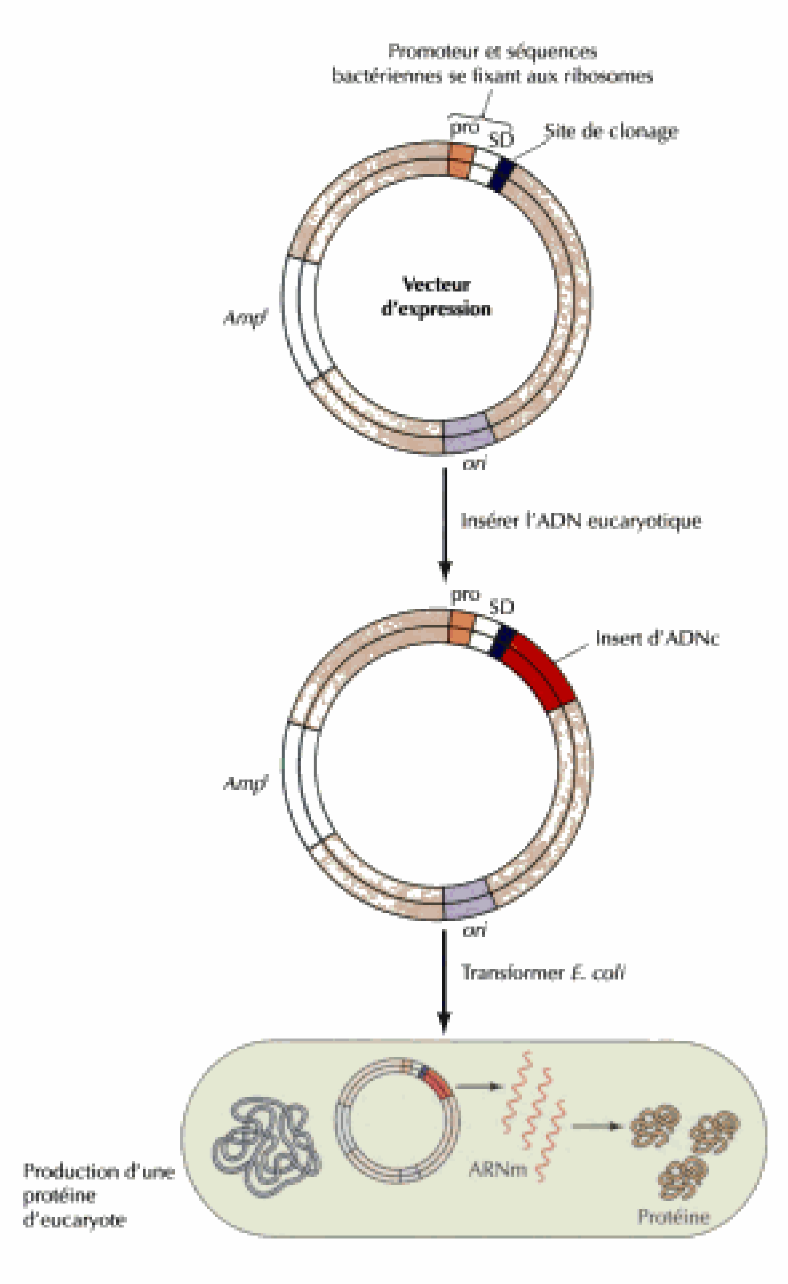


Figure 3.26
Expression d'un gène cloné dans une bactérie. Les vecteurs d'expression possèdent des séquences promotrices (pro) qui commandent la transcription d'un insert d'ADN par la bactérie et des séquences nécessaires à la fixation des ARNm sur les ribosomes bactériens (séquences de Shine-Dalgarno). Tout ADNc d'eucaryote pourvu de ces séquences s'exprime efficacement dans *E. coli* transfecté, lequel synthétise les protéines eucaryotes correspondantes.

Duplication exponentielle d'un ADN par la polymérase

Grâce au clonage moléculaire, on peut multiplier à volonté le premier fragment venu d'ADN *via* une culture bactérienne, puis l'isoler en quantité pondérale. Une autre méthode qui fournit en grande quantité une molécule d'ADN donnée est la **duplication exponentielle en présence de polymérase (PCR)**, mise au point par Kary Mullis en 1988. À condition de connaître une partie de la séquence d'une protéine, la méthode PCR est capable d'amplifier un ADN d'une façon étonnante, *via* des réactions menées entièrement *in vitro*. En somme, l'ADN polymérase sert ici à répliquer à répétition un segment donné d'un ADN ; le nombre de molécules d'ADN produites croît de façon exponentielle, en doublant à chaque vague de réplication, de sorte qu'on récolte une bonne quantité d'ADN en partant d'un très petit nombre de molécules matrice ; ainsi en faisant subir à une seule molécule d'ADN 30 cycles de réplication, on obtient théoriquement 2^{30} molécules filles (près d'un milliard). On arrive donc à amplifier une seule molécule d'ADN jusqu'à en produire une quantité détectable, qu'on isole par clonage moléculaire ou qu'on analyse en la digérant par des endonucléases de restriction ou par séquençage.

La méthode PCR est schématisée dans la figure 3.27. On part soit d'un fragment d'ADN cloné, soit d'un mélange de molécules d'ADN, par exemple l'ADN total de cellules humaines. De ce mélange, on peut amplifier une région d'ADN singulière à condition de connaître la séquence des régions qui la bordent, pour pouvoir fabriquer des amorces susceptibles de promouvoir la synthèse d'ADN en des points bien déterminés. Comme amorces, on synthétise généralement par voie chimique des oligonucléotides de 15 à 20 bases ; on emploie deux amorces pour démarrer la synthèse d'ADN dans les deux sens sur les brins d'ADN complémentaires. On démarre la réaction en chauffant la matrice d'ADN vers les 95 °C, de façon à séparer les deux brins, puis on refroidit le milieu réactionnel, en vue de l'appariement des amorces aux séquences complémentaires des brins matrice. L'ADN polymérase utilise alors les amorces pour synthétiser un nouveau brin, complémentaire de chaque brin matrice. En un cycle, l'amplification a produit deux molécules d'ADN à partir d'une seule molécule matrice. On répète le processus à volonté, chaque cycle doublant le nombre de molécules d'ADN.

Les nombreux cycles de chauffage et de refroidissement consécutifs intervenant dans la méthode PCR se déroulent dans des blocs chauffants programmables, appelés thermocycleurs. L'ADN polymérase (polymérase *Taq*) choisie ici est l'enzyme thermostable de la bactérie *Thermus aquaticus*, présente dans des sources dont la température avoisine les 75 °C. Comme la polymérase *Taq* est stable même à la température élevée requise pour séparer les deux brins d'un ADN bicaténaire, l'amplification PCR est automatisée et rapide. Cette méthode permet aussi d'amplifier des séquences d'ARN, si on utilise la transcriptase inverse pour obtenir une réplique ADNc avant de procéder à l'amplification PCR.

À condition de connaître une séquence d'un gène suffisamment grande pour qu'on puisse choisir des amorces, l'amplification PCR est une méthode tellement puissante qu'elle produit des quantités d'ADN facilement détectables et manipulables, en partant des quelques molécules de l'ADN désiré qui font partie d'un mélange très complexe de molécules d'ADN. On arrive, par exemple, en partant d'ADN génomique total, à amplifier des séquences d'ADN singulières longues de plusieurs kilobases, ou à multiplier un ADNc particulier à partir de l'ensemble des ARN cellulaires. On peut alors manipuler ou étudier ces segments d'ADN amplifiés, par exemple pour déceler des mutations dans le gène auquel on s'intéresse. La méthode PCR est donc un maître atout dans l'arsenal des méthodes mises au point pour recombiner des ADN, notamment dans ses applications, quand on veut faire le diagnostic d'une maladie congénitale, étudier l'expression d'un gène au cours du développement embryonnaire ou résoudre un problème de médecine légale.

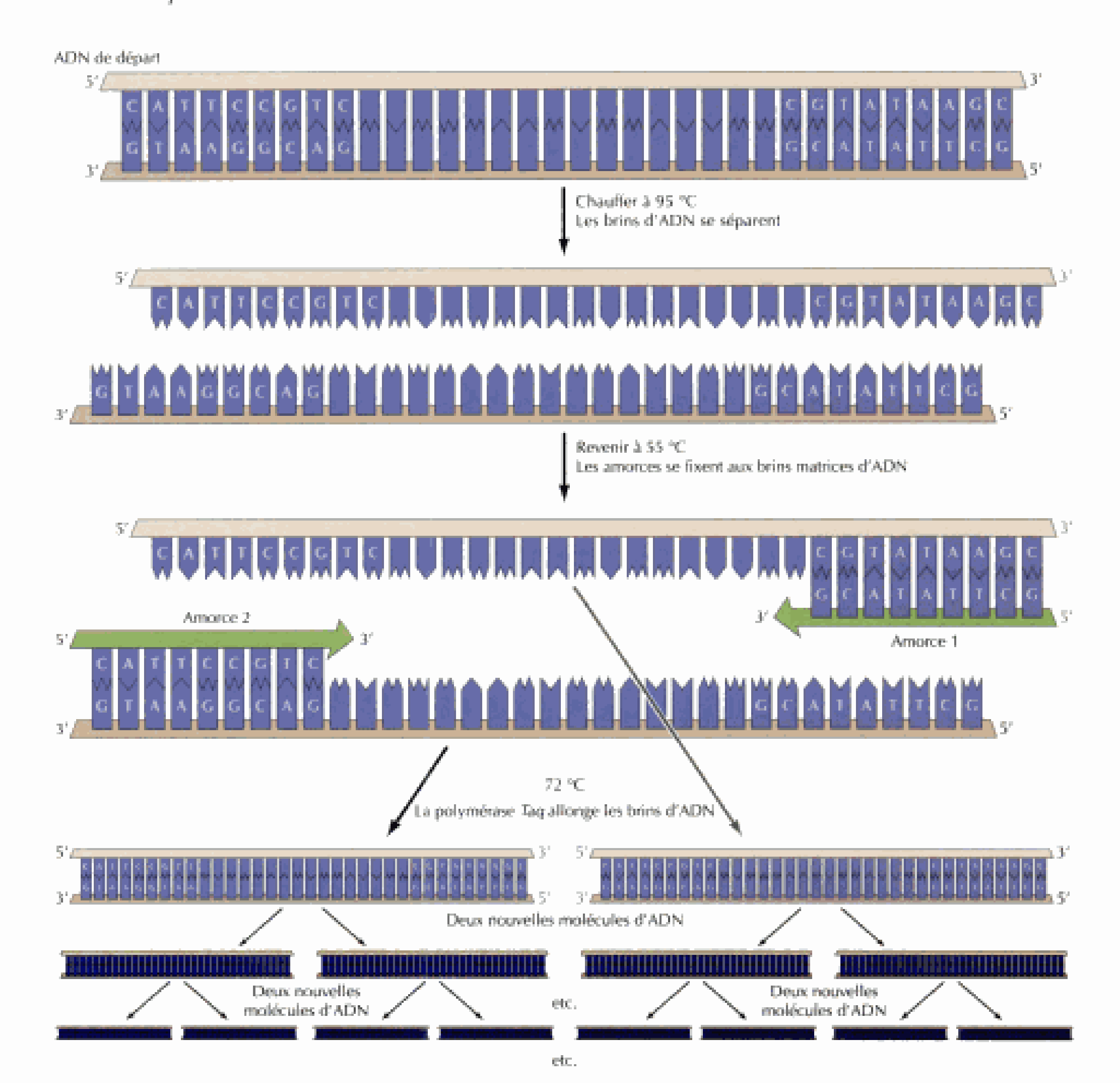


Figure 3.27
Duplication exponentielle d'un ADN par la méthode PCR. La région d'un ADN qui sera amplifiée est celle qui est flanquée des deux séquences utilisées comme amorces. On chauffe d'abord l'ADN bicaténaire originel pour en dissocier les brins, puis on le refroidit pour permettre aux amorces choisies (d'environ 15 à 20 nucléotides) de s'apparier à chacun des brins d'ADN. L'ADN polymérase de *Thermus aquaticus* (polymérase *Taq*) introduite dans la réaction va synthétiser de nouveaux brins d'ADN en partant des amorces, pour former deux nouvelles molécules d'ADN. On répète le processus à volonté, chaque étape doublant la quantité d'ADN.

MISE EN ÉVIDENCE D'UN ACIDE NUCLÉIQUE OU D'UNE PROTÉINE

La mise au point du clonage moléculaire a permis d'isoler et de caractériser un gène donné d'une cellule eucaryote quelconque, sans pour autant mettre au jour le rôle joué par ce gène dans la cellule ; pour ce faire, on doit examiner l'infrastructure du gène en question ainsi que son mode d'expression, et étudier la protéine codée. Voyons les méthodes de base dont on dispose à présent pour détecter un acide nucléique singulier ou une protéine particulière ; elles sont indispensables dans un grand nombre d'expériences, par exemple pour trouver l'emplacement d'un gène sur un chromosome, pour étudier l'expression d'un gène ou encore pour trouver la place d'une protéine donnée dans un organite intracellulaire. On aura aussi besoin de ces méthodes de base pour isoler un gène donné sous forme de clone moléculaire.

Hybridation d'un acide nucléique

La clé du repérage d'une séquence nucléotidique particulière réside dans l'appariement entre les bases de deux brins complémentaires d'ADN ou

d'ARN. À température élevée (par exemple, de 90° à 100 °C), les brins complémentaires d'un ADN se séparent (dénaturation), en donnant deux molécules monocaténaires ; si on incube ces molécules d'ADN dénaturées dans des conditions appropriées (par exemple à 65 °C), elles retrouvent leur nature originelle en hélice bicaténaire, comme le demande l'appariement des bases complémentaires — un processus appelé **hybridation d'acides nucléiques**. On forme des hybrides aussi bien entre deux brins d'ADN que entre deux brins d'ARN ou encore entre un brin d'ADN et un brin d'ARN.

L'hybridation des acides nucléiques permet de détecter les séquences d'ADN ou d'ARN qui sont complémentaires d'un acide nucléique donné isolé à l'état pur, comme un génome viral ou une séquence d'ADN clonée (figure 3.28). Pour ce faire, on marque l'ADN cloné, souvent en le synthétisant en présence de nucléotides radioactifs ; la molécule radioactive ainsi obtenue sert de sonde dans une hybridation aux séquences d'ADN ou d'ARN complémentaires recherchées ; on met les hybrides bicaténaires formés en évidence grâce à leur radioactivité.

Le **transfert selon Southern** (méthode de buvardage mise au point par E. M. Southern) sert dans tous les laboratoires à retrouver un gène singulier noyé dans l'ADN d'une cellule (figure 3.29). On digère l'ADN en question par une endonucléase de restriction, puis on sépare les fragments d'ADN obtenus par une électrophorèse en gel. On couvre alors le gel avec une membrane de nylon ou de nitrocellulose, vers laquelle migrent les molécules d'ADN (buvardage), pour former une réplique du gel. Après un chauffage qui fixe définitivement l'ADN sur la membrane, on incube celle-ci en présence de la sonde radioactive, qui va s'hybrider aux fragments d'ADN contenant la séquence complémentaire à la sonde. On met alors ces fragments en évidence en exposant aux radiations un film radiographique appliqué contre la membrane.

Le **transfert selon Northern** est le pendant de la méthode précédente (d'où son nom), mais appliquée à la détection des ARN. On extrait l'ensemble des ARN cellulaires et on les sépare selon la taille par une électrophorèse en gel. Comme dans la méthode de Southern, les ARN sont transférés sur une membrane et retrouvés par hybridation à une sonde radioactive. La méthode de Northern sert souvent à étudier l'expression des gènes, pour savoir, par exemple, si un ARNm donné est présent dans tel ou tel type de cellule.

L'hybridation des acides nucléiques sert à retrouver des séquences d'ADN ou d'ARN homologues non seulement dans des extraits cellulaires, mais aussi dans des chromosomes ou des cellules intactes — un procédé appelé **hybridation *in situ*** (figure 3.30). Ici, c'est au microscope qu'on découvre l'endroit de la cellule ou d'une structure cellulaire auquel la sonde est allé s'hybrider ; on sait, par exemple, hybrider des sondes marquées à des chromosomes intacts, pour y identifier la région qui porte le gène auquel on s'intéresse, ou encore hybrider une sonde *in situ* pour trouver un ARNm donné dans les cellules d'un tissu particulier.

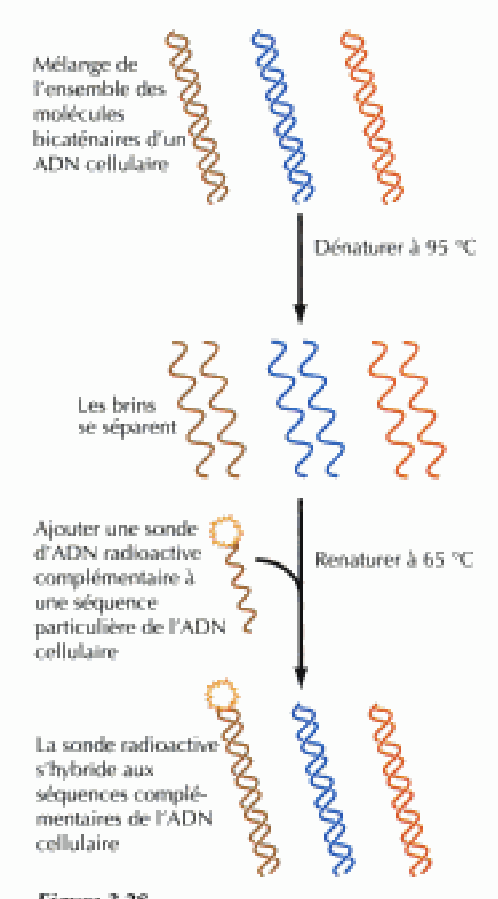


Figure 3.28
Détection d'un ADN par hybridation d'acides nucléiques. On retrouve une séquence définie au milieu d'une infinité de molécules d'ADN en mettant le mélange en présence d'une sonde d'ADN radioactive. On dénature l'ADN à 95° C, de façon à produire des molécules monocaténaires ; on y ajoute la sonde radioactive, puis on abaisse la température à 65° C, pour que les brins d'ADN complémentaires se renaturent par appariement. La sonde radioactive s'hybride aux séquences d'ADN cellulaire complémentaires, qu'on retrouve ensuite sous forme de segments moléculaires bicaténaires radioactifs.

Détection de traces d'ADN ou d'ARN par la méthode PCR

L'amplification de séquences d'ADN par la polymérase est une méthode bien plus sensible que celles de Southern ou de Northern pour trouver des séquences d'ADN ou d'ARN cellulaires. Pour retrouver une séquence sur un gel, la bande en question doit contenir environ 100 000 exemplaires de la séquence d'ADN ou d'ARN recherchée, alors que la méthode PCR est capable d'amplifier une seule molécule d'ADN (ou d'ARN après transcription inverse) jusqu'à en obtenir un taux aisément détectable. Comme on vient de le montrer, la spécificité de l'amplification PCR provient des amorces oligonucléotidiques qui s'hybrident aux séquences complémentaires de la molécule matrice ; aussi, la méthode PCR amplifie-t-elle sélectivement une molécule d'ADN noyée dans un mélange aussi complexe que l'est celui des ADN ou des ARN d'une cellule. C'est pourquoi l'amplification PCR est idéale pour retrouver des molécules d'ADN ou d'ARN particulières dans une quantité minime de matériel biologique, tel le broyat d'une seule

ADN

Digérer l'ADN par une endonucléase de restriction

Une électrophorèse en gel sépare les fragments selon leur taille

Migration

Papier-filtre

Membrane

Gel

Éponge

Solution saline

On dénature l'ADN et on le transfère à la membrane en l'entraînant au travers du gel par une solution saline

Fragments d'ADN

Membrane

On incube la membrane en présente de la sonde radioactive, qui s'hybride aux séquences d'ADN complémentaires

Une autoradiographie de la membrane décèle la sonde fixée, qui marque les fragments d'ADN auxquels elle s'est hybridée

Film radiographique

Figure 3.29
Transfert selon Southern
Au moyen d'une électrophorèse en gel, on sépare les uns des autres les fragments formés par une endonucléase de restriction. On identifie ensuite les fragments en les hybridant à une sonde choisie.

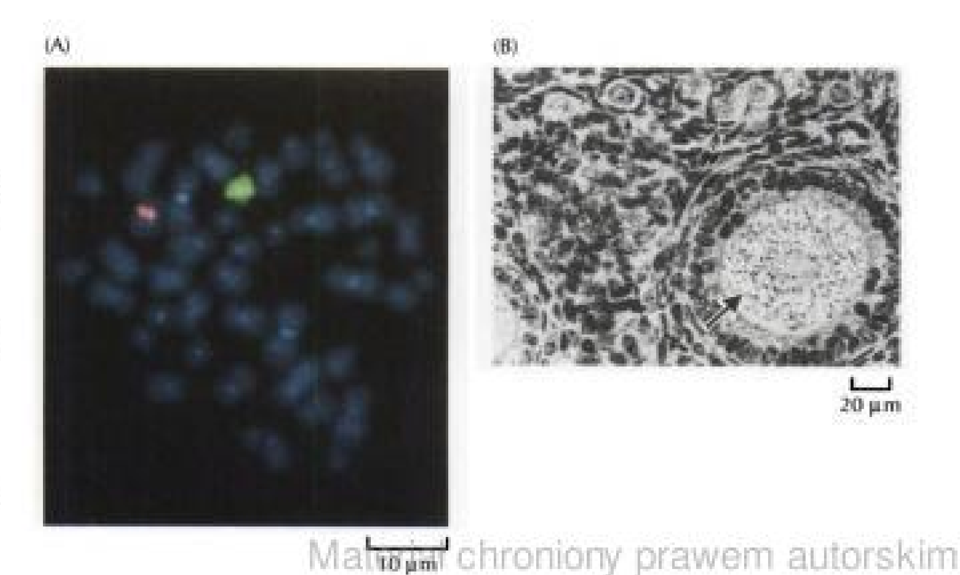


Figure 3.30
Hybridation in situ. (A) Hybridation, aux chromosomes humains, de sondes fluorescentes spécifiques de séquences d'ADN chromosomique X (en vert) et Y (en orange). On a coloré les chromosomes avec une substance fluorescente qui se fixe à l'ADN. (B) À une coupe histologique d'ovaire, on a hybridé une sonde radioactive reconnaissant spécifiquement des gènes exprimés dans l'ovocyte de souris. On a ensuite couvert la coupe avec une émulsion photographique, qui, une fois impressionnée, laisse apparaître des grains d'argent (flèche). (A, aimablement transmise par Ann A. Kiessling, Harvard Medical School ; B, par Debra Wolgemuth, Columbia

cellule. Cette sensibilité extraordinaire a fait que la méthode PCR peut résoudre toutes sortes de problèmes, comme l'examen de l'expression des gènes dans des cellules qui ne sont disponibles qu'en très petite quantité.

Anticorps pour l'identification des protéines

Si on examine l'expression et la fonction d'un gène, on doit pouvoir détecter non seulement son ADN et ses ARN, mais aussi les protéines qu'il code. Dans ce cas, les **anticorps** remplacent les sondes d'acides nucléiques et mettent en évidence des molécules protéiques particulières. Les anticorps sont des protéines sécrétées par certaines cellules du système immunitaire (lymphocytes B) qui réagissent à la présence de molécules (**antigènes**) reconnues pour étrangères par l'organisme hôte, par exemple les protéines d'une capside virale. Le système immunitaire d'un vertébré est capable de produire des millions d'anticorps différents, chacun reconnaissant spécifiquement un antigène singulier, que ce soit une protéine, un glucide ou une molécule d'origine non biologique. Un lymphocyte donné ne produit qu'un seul type d'anticorps, mais les gènes d'anticorps diffèrent d'un lymphocyte à l'autre, à cause d'un réarrangement programmé de leurs gènes au cours de la maturation du système immunitaire (voir chapitre 5). Cette diversification donne naissance à une population de lymphocytes porteurs chacun de gènes d'anticorps uniques, choisis pour répondre à tout une série d'antigènes.

On obtient des anticorps en injectant une protéine quelconque à un animal, par exemple une protéine humaine déterminée à un lapin. Son sérum contiendra un mélange d'anticorps (produits par une population de lymphocytes) qui se fixent à plusieurs sites de l'antigène utilisé pour l'immunisation. On peut cependant obtenir aussi des anticorps de spécificité unique (**anticorps monoclonaux**) en cultivant des lignées clonales de lymphocytes B prélevés à des animaux immunisés (souvent des souris) ; comme chaque lymphocyte est programmé pour ne produire qu'une espèce d'anticorps qui lui est propre, toute lignée clonale lymphocytaire produira un anticorps monoclonal qui ne reconnaît qu'un seul déterminant antigénique, c'est-à-dire un réactif immunologique très spécifique.

Bien qu'on produise des anticorps dressés contre des protéines cellulaires purifiées, on peut immuniser l'animal avec d'autres substances, par exemple, avec des cellules entières, dans le but d'obtenir des anticorps dirigés contre des protéines inconnues exprimées dans un type cellulaire particulier, par exemple une cellule tumorale. Ce type d'anticorsps servira à identifier les protéines produites par le type particulier de cellule ayant servi à l'immunisation. En outre, on a pris l'habitude de faire produire des anticorps contre des protéines exprimées par des clones bactériens recombinants ; le clonage moléculaire permet ainsi d'obtenir des anticorps contre des protéines qu'on n'arrive pas à isoler des cellules eucaryotes. On peut aussi dresser des anticorps contre des peptides synthétiques de seulement 10 à 15 résidus d'acide aminé, au lieu de les dresser contre l'ensemble de la protéine. Il suffit donc de connaître la séquence d'un gène pour préparer des anticorps reconnaissant des peptides synthétisés sur une région particulière de la séquence peptidique prédite. Comme ces anticorps réagissent souvent aussi avec la protéine entière, on sait donc préparer des anticorps contre une protéine native pourvu qu'on connaisse la séquence du gène cloné correspondant.

Tout une série de méthodes utilisent des anticorps pour détecter telle ou telle protéine dans un extrait cellulaire. Deux des mieux connues sont l'**immunoblotting** (appelé aussi **transfert à la Western**) et l'**immunoprécipitation**. La première est une variante de la méthode Southern (figure 3.31). On com-

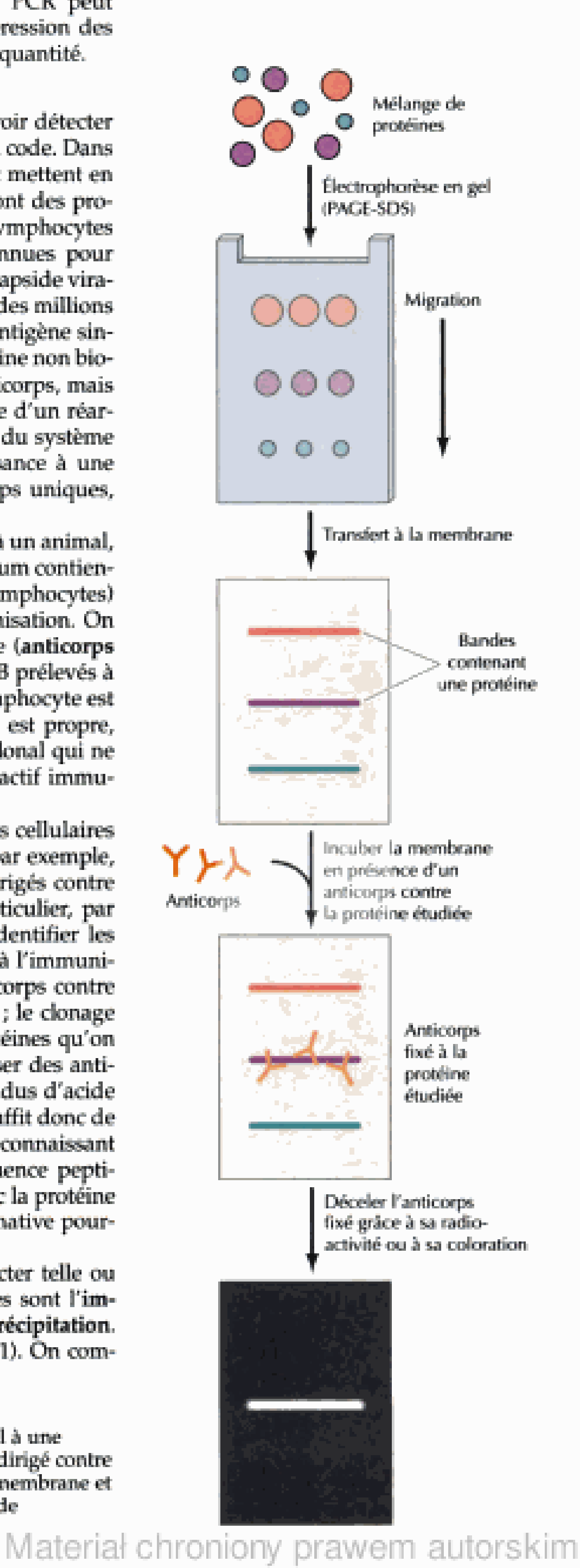


Figure 3.31
Transfert Western. On sépare les protéines selon leur taille par une électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS et on les transfère du gel à une membrane. On incube alors la membrane en présence d'un anticorps dirigé contre la protéine recherchée. L'anticorps va se fixer à la protéine collée à la membrane et on le met en évidence à l'aide de divers réactifs, par exemple une sonde radioactive qui reconnaît l'anticorps.

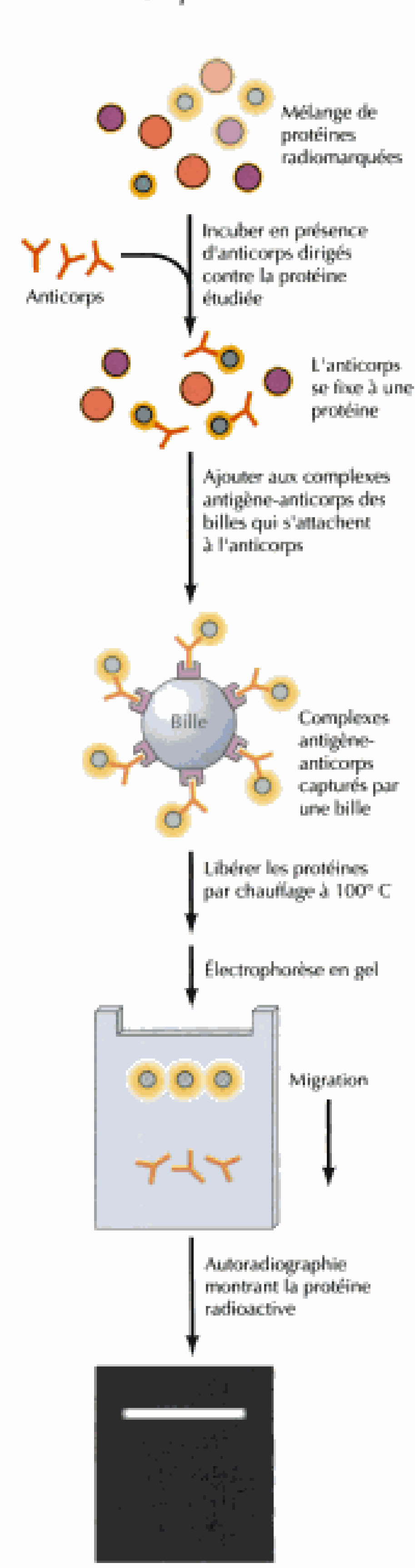


Figure 3.32
Immunoprécipitation. On incube le mélange de protéines radiomarquées en présence d'un anticorps qui forme des complexes avec la protéine qui a servi à immuniser l'animal (l'antigène). On recueille ces complexes sur des billes qui possèdent une grande affinité envers l'anticorps. On chauffe les billes pour en dissocier les complexes antigène-anticorps et les protéines libérées se séparent dans une électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS. Les protéines radiomarquées apparaissent après développement de l'autoradiographie.

mence par fractionner les protéines d'un extrait cellulaire selon leur taille dans un gel d'électrophorèse ; comme les protéines se distinguent par la taille et la charge, on doit adapter le procédé décrit pour les acides nucléiques. Pour les protéines, on emploie la méthode d'**électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS (SDS-PAGE)** : on dissout l'échantillon de protéines dans une solution contenant un détergent anionique, le dodécylsulfate de sodium (SDS). Chaque molécule de protéine capte un grand nombre de molécules de détergent, qui dénaturent la protéine et lui confère une charge négative globale, de sorte que les protéines du mélange migrent toutes vers l'anode, à une vitesse dépendant seulement de leur taille (comme pour les acides nucléiques). L'électrophorèse terminée, on fait passer les protéines sur une membrane, qu'on place au contact d'anticorps dirigés contre la protéine recherchée. Par diverses méthodes, on retrouve l'anticorps fixé à la membrane, ce qui permet d'identifier la protéine contre laquelle l'anticorps est dirigé.

Dans l'immunoprécipitation, l'anticorps sert à isoler la protéine contre laquelle il est dirigé (figure 3.32). Classiquement, on incube les cellules avec des acides aminés radioactifs, de façon à marquer les protéines ; l'extrait protéique marqué est mis en présence d'un anticorps, qui se fixe à la protéine antigénique cible. On isole alors le complexe antigène-anticorps formé et on le soumet à une électrophorèse, qui, après autoradiographie, montre la place de l'antigène radioactif sur le gel d'électrophorèse.

Comme on l'a annoncé au chapitre 1, on utilise aussi les anticorps pour identifier les protéines au sein des cellules ainsi que dans les lysats de cellules. On peut, par exemple, colorer les cellules avec des anticorps couplés à des substances fluorescentes et observer la distribution intracellulaire de l'une ou l'autre protéine antigénique au microscope à fluorescence (voir figure 1.27). On sait aussi coupler les anticorps avec des étiquettes visibles au microscope électronique, par exemple des métaux lourds, qui identifient une protéine antigénique à l'échelle ultrastructurale.

Sondes destinées au criblage des banques d'ADN recombinant

Les méthodes mises au point pour retrouver un acide nucléique ou une protéine donnés dans un extrait cellulaire servent aussi à identifier les clones moléculaires porteurs d'un insert d'ADN cellulaire particulier. Ainsi, en hybridant des acides nucléiques, on arrive à identifier des clones d'ADN génomique ou d'ADNc possédant des séquences d'ADN pour lesquelles une sonde est disponible. Les clones d'ADNc portés par des vecteurs d'expression sont aussi identifiables si on dispose d'anticorps dirigés contre les protéines codées par ces ADNc.

Pour isoler des clones d'ADN génomique ou d'ADNc, on commence souvent par préparer des **banques d'ADN recombinants**, c'est-à-dire des collections de clones qui contiennent toutes les séquences du génome ou des ARNm d'un type de cellule particulier (figure 3.33). On prépare une **banque d'ADN génomique**, par exemple humain, en clonant des fragments quelconques d'ADN d'environ 15 kb dans un vecteur λ ; comme la taille du génome humain atteint 3 x 10^6 kb, on devrait trouver l'équivalent ADN d'un génome dans 200 000 de ces clones λ. À cause des fluctuations statistiques lors de l'échantillonnage, la banque de 200 000 recombinants sera cependant dépourvue d'un grand nombre de gènes et pourvue d'autres gènes en de nombreux exemplaires. Aussi prépare-t-on de plus vastes banques, de près d'un million de phages recombinants, de façon que la collection obtenue

contienne, avec une haute probabilité, tous les gènes intéressants.

D'une banque de cette qualité, on isole facilement tout gène pour lequel une sonde est disponible. Il suffit d'étaler les phages recombinants sur une culture de *E. coli*, où chaque phage va se répliquer en formant une plage (de lyse) sur le lit de bactéries ; on presse alors les plages contre un filtre, comme on le fait pour transférer l'ADN d'un gel à une membrane lors du transfert à la Southern, puis on hybride les filtres avec une sonde radioactive de façon à reconnaître les plages de phages qui portent le gène auquel on s'intéresse. De la boite de culture, on prélève ensuite la plage choisie, puis on laisse se reproduire ce clone de phage qui porte l'insert cellulaire désiré. De la même façon, on crible les colonies bactériennes portant des clones d'ADN plasmidien, avec l'espoir de trouver un clone particulier en hybridant la sonde à des banques de phages ou de plasmides recombinés.

On dispose de tout une série de sondes pour cribler les banques de recombinants : soit un clone d'ADNc sert de sonde pour isoler le clone génomique correspondant, soit un gène cloné chez une espèce (par exemple, la souris) sert à isoler le gène apparenté d'une autre espèce (par exemple, l'Homme). Outre les fragments d'ADN isolés, on se sert aussi comme sonde d'oligonucléotides synthétiques, ce qui permet d'isoler des

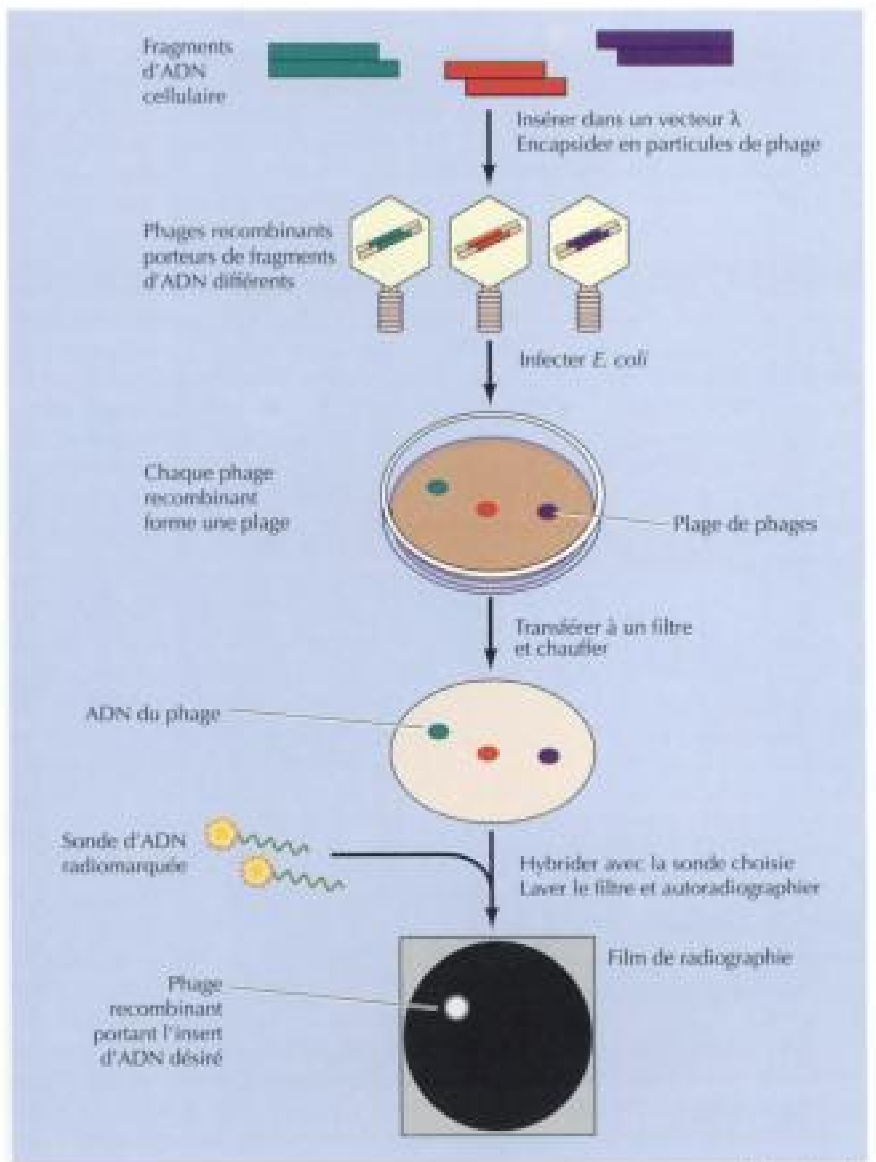


Figure 3.33
Criblage d'une banque recombinante par hybridation. On clone des fragments d'ADN dans un bactériophage λ vecteur, puis on forme des particules par encapsidation, pour obtenir une population de phages recombinant portant divers inserts. Ces phages servent à infecter une culture bactérienne, que l'on couvre ensuite d'un filtre. Une partie des phages de chaque plage adhère au filtre, que l'on hybride alors à une sonde radioactive, de façon à identifier la plage de phages qui possède le gène désiré. De la boite de culture, on prélève cette plage de lyse pour produire une culture pure des bactéries pourvues de ce phage.

gènes en se basant sur de courtes séquences d'acides aminés de la protéine codée. On arrive à fabriquer des oligonucléotides de 15 à 20 bases calqués sur un fragment de la séquence d'acides aminés d'une protéine choisie ; ces oligonucléotides vont servir de sonde pour isoler des clones d'ADNc, qu'il est bien plus facile de séquencer (on l'a déjà dit) et de caractériser que la protéine elle-même. La stratégie expérimentale passe donc ainsi de la séquence peptidique partielle d'une protéine à l'isolement d'un gène cloné.

Une autre approche utilisée pour isoler un gène en se basant sur une caractéristique de sa protéine consiste à se servir d'anticorps comme sondes pour cribler des banques « d'expression ». Dans ce cas, on prépare une **banque d'ADNc** dans un vecteur d'expression qui pilote la synthèse de la protéine chez *E. coli* ; on transfère alors les plages de phages ou les colonies bactériennes sur un filtre, comme décrit ci-dessus, mais ici on incube le filtre en présence d'anticorps (comme dans le transfert à la Western), de façon à retrouver les clones qui produisent la protéine à laquelle on s'intéresse.

Ces méthodes d'identification de clones moléculaires et de détection d'un gène et de produits de ce gène dans la cellule illustrent l'adaptabilité de la méthodologie de l'ADN recombinant. Au départ de n'importe quel gène cloné, on sait non seulement en déterminer la séquence nucléotidique et s'en servir comme sonde pour savoir comment ce gène est structuré et est transcrit, mais aussi exprimer ce gène et obtenir des anticorps contre la protéine codée. Inversement, on peut cloner un gène dès qu'on connaît quelque peu la protéine qu'il code, en utilisant comme sonde un oligonucléotide ou un anticorps. Grâce aux méthodes de l'ADN recombinant, la démarche expérimentale va à présent de l'ADN à la protéine codée ou de la protéine à l'ADN correspondant, conférant une grande plasticité aux stratégies d'examen des gènes eucaryotes et des protéines codées par ces gènes.

FONCTION DES GÈNES D'EUCARYOTES

Si les méthodes de recombinaison d'ADN que nous venons de décrire sont des moyens puissants pour isoler et caractériser minutieusement les gènes des cellules d'eucaryote, on ne saisit cependant pas bien la nature de la fonction d'un gène sans en examiner le comportement au sein d'une cellule ou d'un organisme, et pas seulement en tant que clone moléculaire au sein d'une bactérie. En génétique classique, on a d'habitude découvert la fonction de tel ou tel gène d'après le phénotype altéré d'organismes mutants. La mise au point de la stratégie de l'ADN recombinant a ajouté une nouvelle dimension aux études du fonctionnement d'un gène, en ce sens que nous pouvons examiner directement la fonction d'un gène en introduisant l'ADN cloné en question dans des cellules d'eucaryote. Chez un eucaryote simple, comme une levure, cette méthode a permis d'isoler les clones moléculaires correspondant à pratiquement tous les gènes mutés. On dispose en outre de plusieurs moyens pour introduire un gène cloné non seulement dans des cellules animales ou végétales en culture, mais aussi dans un organisme entier, dans le but de connaître le rôle joué par ce gène. On peut coupler ces approches expérimentales à la faculté de produire *in vitro* des mutations dans tel ou tel ADN cloné : les méthodes de l'ADN recombinant s'en trouvent alors plus efficaces au moment d'étudier les fonctions de ces gènes dans des organismes plus complexes.

Analyse génétique chez les levures

Les levures sont particulièrement propices à l'étude de la biologie moléculaire des eucaryotes (voir chapitre 1). Le génome de *Saccharomyces cerevisiae*, long d'environ $1,4 \times 10^7$ paires de bases, est 200 fois plus petit que le génome humain. En outre, on peut aisément multiplier les levures en culture, puisqu'elles s'y divisent toutes les deux heures ; les levures offrent donc les mêmes avantages fondamentaux que les bactéries, à savoir, petit génome et reproduction rapide.

On identifie les mutations chez une levure aussi facilement qu'on le fait chez *E. coli*, puisqu'on isole aisément tel mutant de levure qui exige un acide aminé

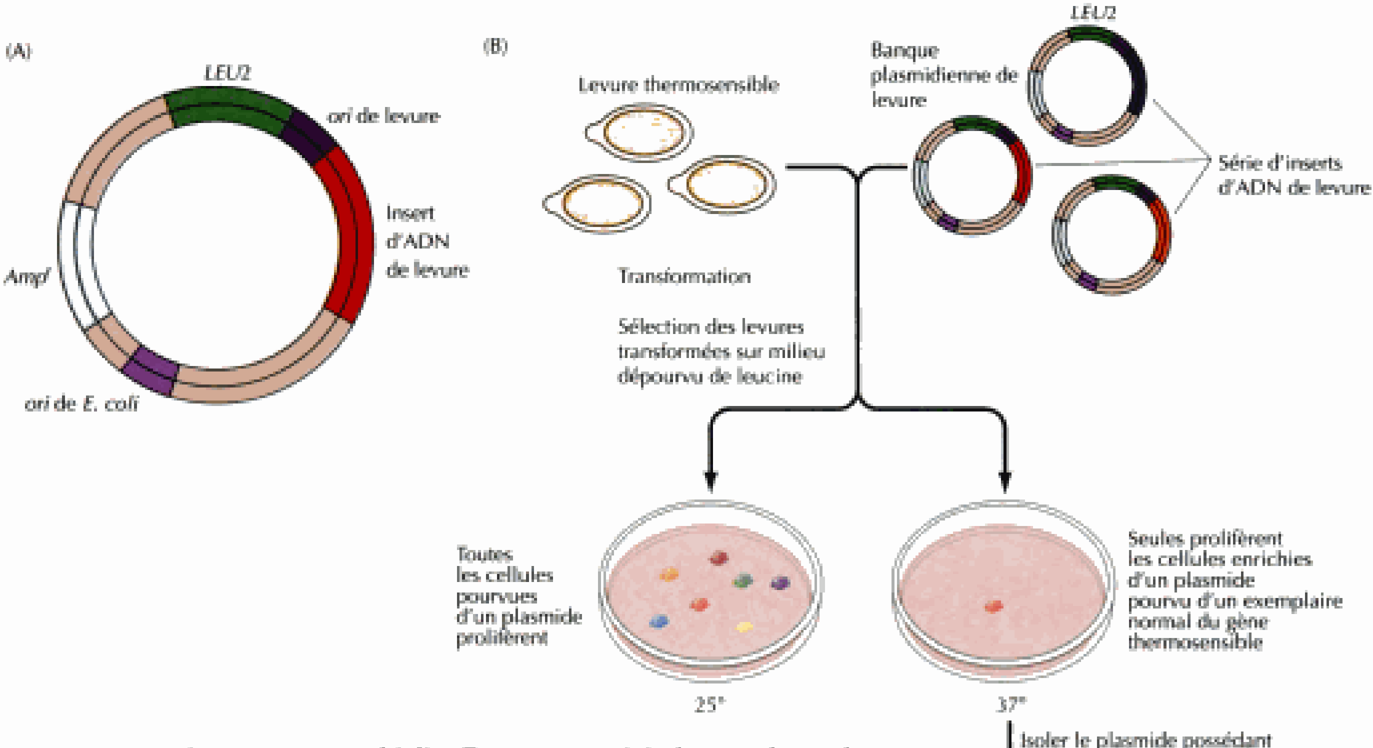


Figure 3.34
Clonage d'un gène de levure. (A) Vecteur adapté à une levure. Il comporte une origine de réplication bactérienne (*ori*) et un gène de résistance à l'ampicilline (*Amp*r), qui fait qu'on peut le faire se multiplier sous forme de plasmide chez *E. coli*. De plus, le vecteur possède une origine de réplication adaptée à la levure et un gène marqueur (*LEU2*) qui permet de sélectionner les cellules transformées. Comme le gène *LEU2* code un enzyme intervenant dans la synthèse de la leucine, on sélectionne les transformants en faisant pousser les levures sur un milieu dépourvu de leucine. (B) Isolement d'un gène de levure. On identifie le gène étudié *via* une mutation thermosensible, autrement dit qui laisse la levure proliférer à 25 °C, mais pas à 37 °C. Pour isoler un clone du gène, on transforme les mutants thermosensibles avec une banque de plasmides comportant une collection de gènes couvrant le génome entier de la levure normale. Toute cellule de levure transformée par de l'ADN plasmidien va se multiplier à 25 °C sur le milieu dépourvu de leucine, mais seules vont proliférer à 37 °C les cellules de levure enrichies d'un plasmide portant un exemplaire normal du gène en question. Il reste alors à isoler le plasmide en prélevant les cellules de levure transformées qui forment des colonies à la température non permissive.

ou un autre nutriment pour se multiplier. En outre, on sait isoler sous forme de **mutants thermosensibles** les levures déficitaires dans des gènes assurant les processus cellulaires primordiaux (au contraire des déficits métaboliques). Ces mutants codent des protéines actives à une certaine température (température permissive), mais pas à une autre température (température non permissive), alors qu'à l'état normal, ces protéines fonctionnent aux deux températures. Une levure possédant une mutation thermosensible dans un gène essentiel sera capable de se multiplier seulement à la température permissive. Puisqu'on sait isoler ces mutants thermosensibles, on arrive à identifier les gènes commandant plusieurs processus cellulaires fondamentaux chez la levure, notamment la synthèse et la maturation des ARN, la révolution du cycle cellulaire et le transport des protéines d'un compartiment cellulaire à un autre.

Grâce à la relative simplicité de la génétique des levures, on clone le gène de levure correspondant à la première mutation venue, simplement en se basant sur l'activité fonctionnelle de ce gène (figure 3.34). On commence par construire une banque d'ADN génomique de levure normale dans des vecteurs qui se répliquent sous forme de plasmides tant dans une levure que chez *E. coli*. Vu la taille réduite du génome de levure, il suffit de quelques milliers de plasmides pour obtenir une banque complète. On emploie alors un mélange de ces plasmides pour transfecter un mutant thermosensible de levure et on sélectionne les transformants qui sont capables de se multiplier à température non permissive ; ceux-ci ont acquis un exemplaire normal du gène étudié, sous forme d'ADN plasmidien, qu'on isole facilement des cellules de levure transfectées, en vue de le caractériser minutieusement.

C'est de cette façon qu'on a identifié les gènes de levure codant une panoplie de protéines essentielles. Souvent, ces gènes isolés d'une levure se révèlerent très utile pour identifier et cloner les gènes apparentés des cellules de mammifères. La génétique rudimentaire des levures a donc non seulement servi de modèle important de la cellule eucaryote, mais a aussi permis le clonage direct de gènes apparentés appartenant à des organismes plus complexes.

Transfert de gène chez les plantes et les animaux

Quoique les cellules d'un eucaryote complexe soient réfractaires aux manipulations génétiques simples permises chez les levures, on peut cependant y

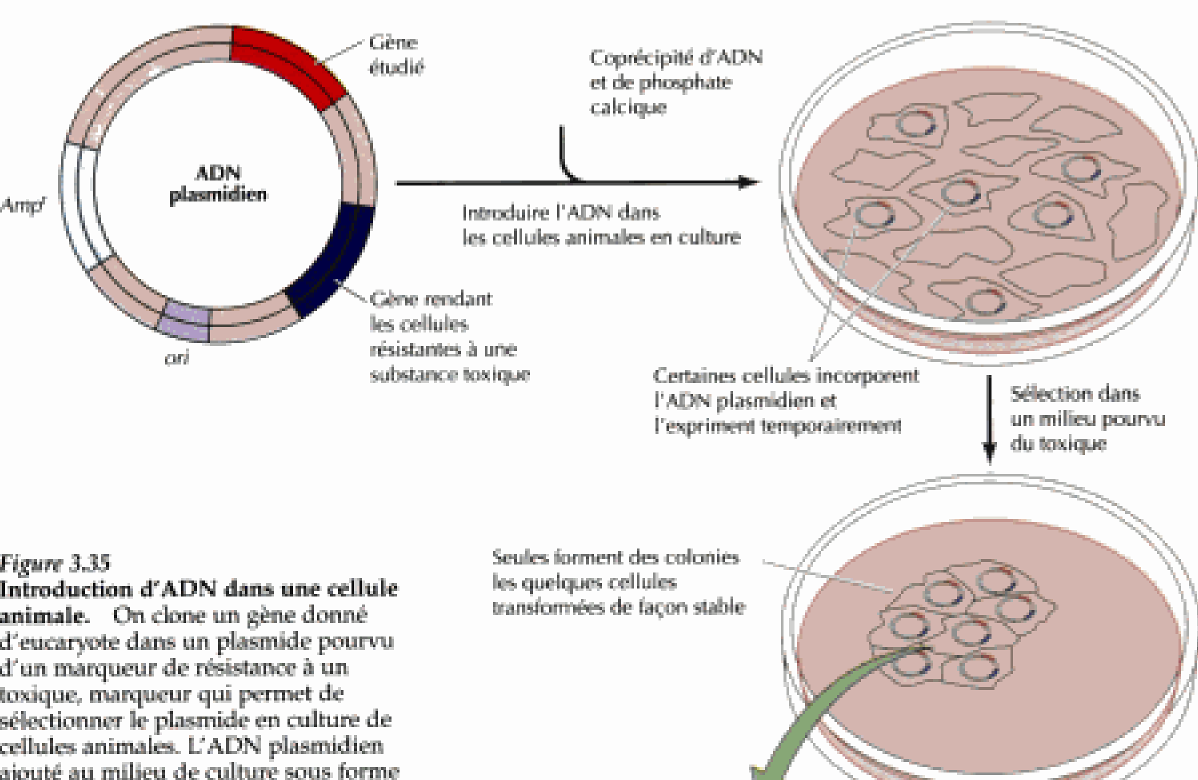


Figure 3.35
Introduction d'ADN dans une cellule animale. On clone un gène donné d'eucaryote dans un plasmide pourvu d'un marqueur de résistance à un toxique, marqueur qui permet de sélectionner le plasmide en culture de cellules animales. L'ADN plasmidien ajouté au milieu de culture sous forme de coprécipité avec du phosphate calcique est absorbé par les cellules et exprimé par certaines d'entre elles pendant quelques jours (expression transitoire). Grâce à leur faculté de proliférer sur un milieu imprégné du toxique choisi, on récupère les cellules transformées de façon définitive, c'est-à-dire celles qui ont intégré l'ADN plasmidien dans leur ADN chromosomique.

étudier le fonctionnement des gènes en introduisant un clone d'ADN à l'intérieur de certaines cellules végétales ou animales. Pareilles expériences (appelées en général **transfert de gène**) se sont révélées capitales pour résoudre maintes questions, notamment celles de savoir quels mécanismes ajustent l'expression d'un gène et la maturation de la protéine correspondante. En outre, comme on va le voir, le transfert de gène a permis d'identifier et de caractériser les gènes qui commandent la croissance cellulaire et le développement embryonnaire, parmi lesquels une série de gènes responsables de la division anarchique des cellules cancéreuses humaines.

On introduit habituellement l'ADN dans les cellules animales en culture sous forme d'un co-précipité d'ADN et de phosphate calcique (figure 3.35). Comme la méthodologie fut mise au point pour introduire de l'ADN viral infectieux dans des cellules animales, on lui donne souvent le nom de **transfection** (pour *trans*formation + in*fection*). En présence d'un précipité de ce type, les cellules admettent d'abord l'ADN dans leur cytoplasme, puis dans leur noyau, où il subit pendant plusieurs jours une transcription, appelée **expression transitoire**. Dans une petite proportion des cellules (au maximum 0,1 %) l'ADN étranger s'intègre de façon stable au génome cellulaire et est transmis aux descendants au moment de la mitose, comme il arrive à tout autre gène cellulaire. On arrive à isoler ces cellules transformées de façon stable, à condition que l'ADN transfecté contienne un marqueur de sélection, conférant par exemple une résistance à une substance qui inhibe la croissance des cellules normales. En l'ajoutant à un marqueur de résistance envers un toxique qui permet de reconnaître les transformants, le premier gène cloné venu peut donc être introduit dans une cellule de mammifère ; ceci permet

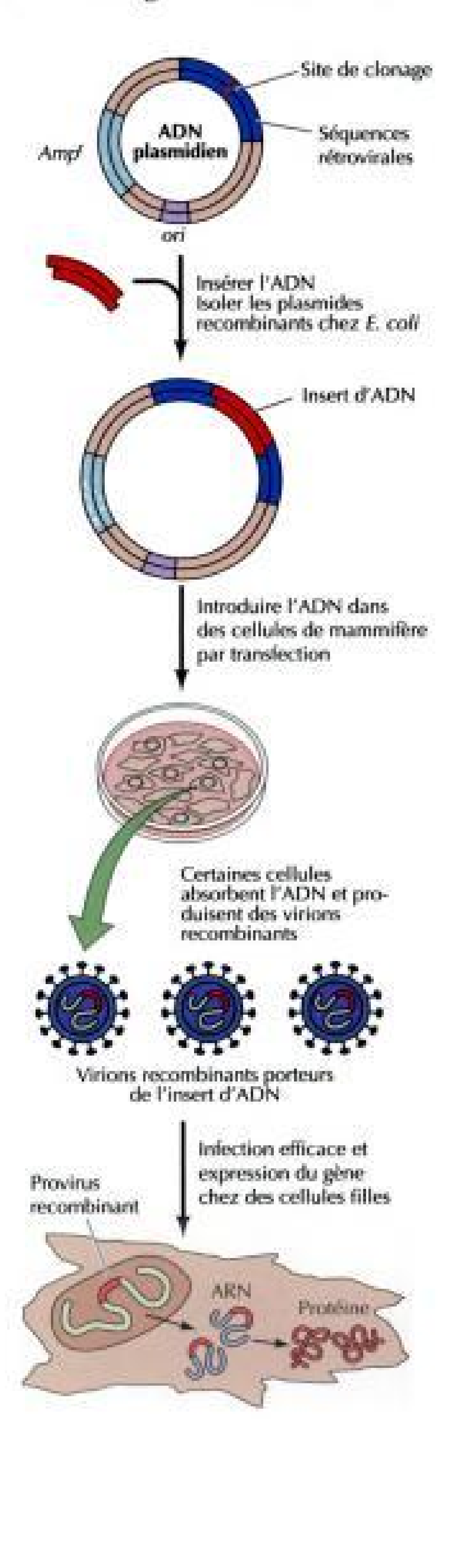


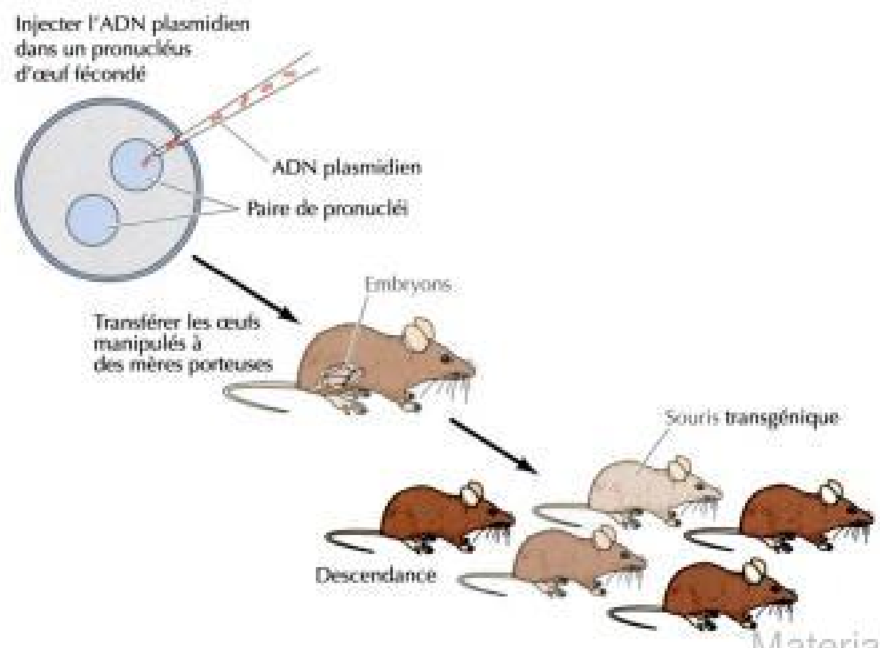
Figure 3.36
Vecteurs rétroviraux Le vecteur comporte des séquences rétrovirales clonées dans un plasmide que l'on peut multiplier chez *E. coli*. On insère l'ADN étranger dans les séquences virales et on isole les plasmides recombinants dans une bactérie. On transfecte ensuite des cellules animales en culture avec l'ADN recombinant ; celui-ci est incorporé par quelques rares cellules, qui vont produire des rétrovirus recombinants porteurs de l'ADN inséré. Ces rétrovirus recombinants serviront alors à infecter de façon efficace d'autres cellules, dans l'ADN chromosomique desquelles le génome viral porteur du gène inséré ira s'intégrer sous forme de provirus.

d'examiner l'effet d'un gène cloné sur le comportement d'une cellule, par exemple sur sa capacité de proliférer ou de se différencier.

Selon l'expérience envisagée, plusieurs autres méthodes servent à introduire de l'ADN dans des cellules de mammifère, notamment la micro-injection directe d'ADN dans le noyau cellulaire, l'incorporation d'ADN dans des vésicules lipidiques (**liposomes**) qui fusionnent avec la membrane de la cellule, ou encore un bref choc électrique à travers les cellules, qui forme de façon transitoire des pertuis dans la membrane plasmique (**électroporation**). Pour transfecter de façon plus efficace un ADN cloné dans des cellules, on se servira aussi, comme vecteurs, de virus animaux, particulièrement de rétrovirus, car leur cycle biologique passe par une intégration stable de l'ADN viral dans le génome de la cellule infectée (figure 3.36). Aussi les vecteurs rétroviraux servent-ils à introduire efficacement des gènes clonés dans maintes espèces cellulaires, et sont de ce fait d'importants véhicules pour tout une série d'applications, comme la thérapie génique.

On sait aussi introduire des gènes clonés dans la lignée germinale des organismes pluricellulaires, de façon à étudier leur comportement dans l'animal entier, plutôt que en culture de cellules. On obtient des souris pourvues de ce type de gène étranger (**souris transgéniques**) en injectant avec une microaiguille de l'ADN cloné dans le pronucléus d'un œuf fécondé (figure 3.37). On rend ensuite l'œuf injecté à une mère-porteuse et on attend l'accouchement. Dans certains cas (souvent 10 %), l'ADN étranger se sera intégré

Figure 3.37
Génération de souris transgéniques. On injecte de l'ADN dans le pronucléus d'œufs fécondés de souris (ils contiennent deux pronucléi, un hérité de la mère, l'autre du père). On introduit ces œufs chez des mères porteuses et on les laisse se développer. Certains descendants (transgéniques) ont incorporé l'ADN injecté dans leur génome.



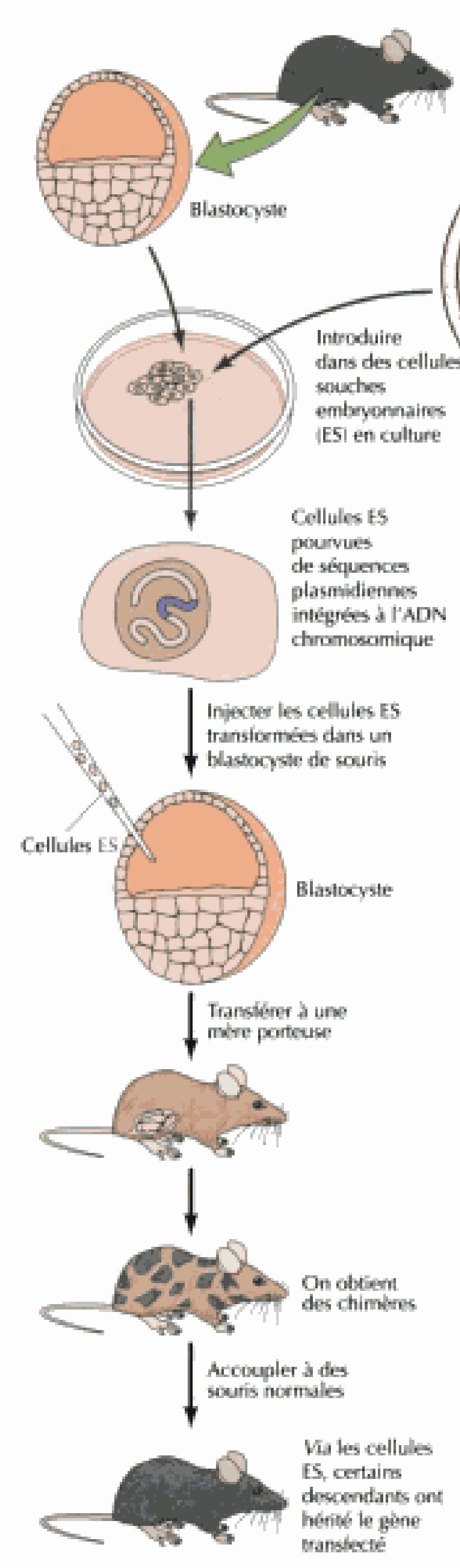


Figure 3.38
Introduction de gènes chez la souris *via* des cellules souches embryonnaires. Les cellules souches embryonnaires (ES) sont des cellules prélevées à de jeunes embryons de souris (blastocystes) et mises en culture. Elles acceptent de l'ADN étranger et on peut isoler celles qui l'ont intégré de façon stable. Une fois introduites dans un blastocyste receveur, ces cellules ES transformées participent au développement normal de l'embryon. Parmi les nouveaux-nés issus des embryons implantés chez les mères porteuses, certains possèdent donc, à côté de cellules issues de cellules normales du blastocyste, des cellules dérivées des cellules ES transformées. Comme ces souris sont des mosaïques de types cellulaires différents, on les appelles des chimères. Pour obtenir des descendants porteurs du gène transfecté, on fait se reproduire les souris chimères chez lesquelles les cellules-filles des cellules ES transformées ont fondé la lignée germinale.

au génome de l'œuf fécondé, et ce faisant, dans toutes les cellules de l'animal qui en est issu. Comme l'ADN étranger est présent aussi bien dans les cellules germinales que dans les cellules somatiques, il passera, comme tout gène cellulaire, à tous les descendants.

Chez la souris, on peut encore introduire un gène cloné en profitant des propriétés des **lignées de cellules embryonnaires (ES)** (figure 3.38). On établit des cultures de ces cellules embryonnaires en partant de jeunes embryons de souris ; on sait aussi les réintroduire ensuite dans ces embryons, où ils participent normalement au développement de l'embryon et donnent naissance à tous les tissus de l'adulte, y compris ses cellules germinales. Il est donc possible d'introduire de l'ADN cloné dans des cellules ES en culture, de sélectionner les cellules transformées de façon stable puis de réintroduire ces cellules dans un embryon de souris. La descendance d'un tel embryon donnera naissance à des chimères, c'est-à-dire à des individus chez lesquels certaines cellules dérivent de cellules de l'embryon normal et d'autres des cellules ES transfectées. Chez certains de ces animaux, les cellules ES font partie de la lignée germinale ; en laissant ces animaux se reproduire, on produit une famille de descendants ayant hérité du gène transfecté.

On sait aussi introduire des ADN clonés dans des cellules végétales. En éliminant d'abord la paroi cellulaire, on obtient des protoplastes, c'est-à-dire des cellules entourées seulement de leur membrane plasmique ; on y introduit alors l'ADN par électroporation, comme on vient de le décrire pour les cellules animales. Parfois, on introduit l'ADN dans les cellules végétales entières en les bombardant avec des microprojectiles, par exemple de petites particules de tungstène enrobées d'ADN ; en projetant ces particules directement dans les cellules végétales, on tue une partie des cellules, mais il en reste suffisamment qui se transforment de façon stable.

Pour introduire un ADN recombiné dans des cellules végétales, une méthode plus efficace consiste à utiliser des virus végétaux. D'ailleurs, un plasmide de la bactérie *Agrobacterium tumefaciens* (le **plasmide Ti**) offre un véhicule nouveau pour introduire de l'ADN cloné dans diverses plantes (figure 3.39). Dans la nature, *Agrobacterium* se colle aux feuilles et cède son plasmide Ti aux cellules foliaires, qui l'incorporent dans leur ADN chromosomique ; voilà pourquoi les vecteurs issus du plasmide Ti peuvent introduire de l'ADN recombinant dans les cellules végétales qui leur sont sensibles. Comme on arrive à régénérer beaucoup de plantes à partir d'une seule cellule en culture (voir chapitre 1), on obtient directement des plantes transgéniques à partir de cellules qu'on a transformées, en culture, avec de l'ADN recombinant, un procédé combien plus simple que celui mis au point pour obtenir un animal transgénique.

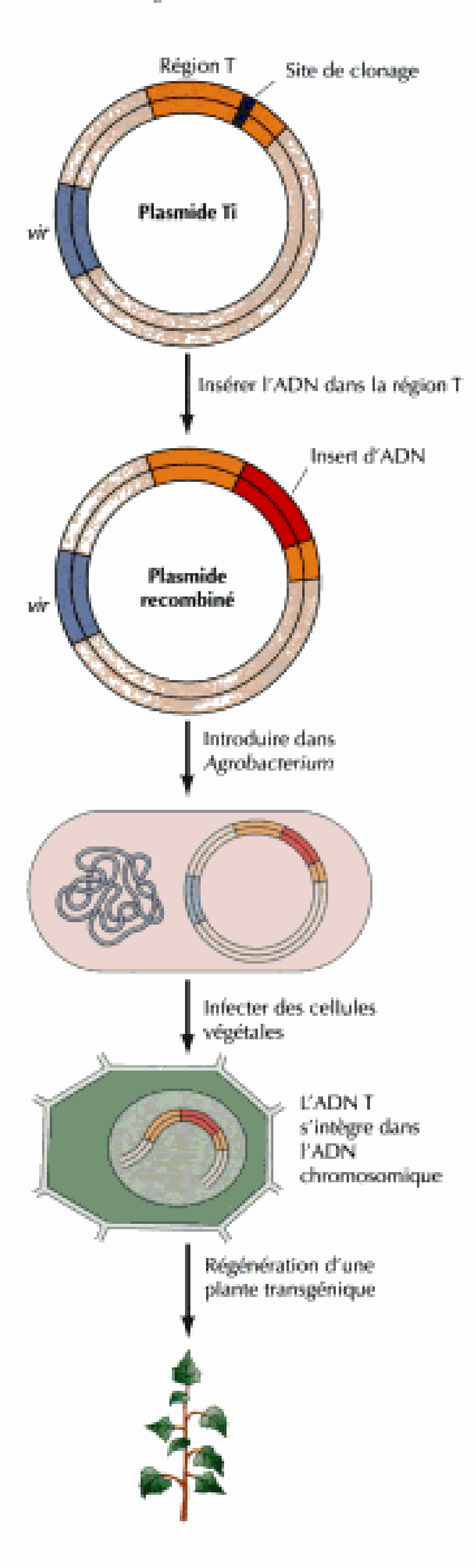


Figure 3.39
Introduction de gènes dans une plante via le plasmide Ti. Le plasmide Ti porte une région T capable de passer au génome de la plante, ainsi que des gènes de virulence (*vir*) qui contribuent à ce transfert. Dans les vecteurs construits à partir de Ti, on insère l'ADN étranger dans la région T. On introduit alors le plasmide recombiné dans *Agrobacterium tumefaciens*, avec lequel on infecte ensuite des cellules végétales en culture. La région T du plasmide (elle porte l'insert d'ADN) est transférée à la cellule végétale et s'intègre à son ADN chromosomique. Ces cellules transformées reformeront une plante entière.

Mutagenèse d'un ADN cloné

Dans les expériences de génétique classique, par exemple chez les bactéries ou les levures, il suffit d'examiner le phénotype modifié d'un organisme mutant pour identifier le gène impliqué et saisir sa fonction ; on reconnaît le gène muté à ceci qu'il produit des modifications phénotypiques visibles, par exemple le fait que la cellule prolifère plus ou moins selon la température de croissance et selon le taux d'un nutriment particulier dans le milieu. Néanmoins, la faculté d'isoler un gène *via* la méthode de l'ADN recombinant a ouvert de nouvelles voies à la mutagenèse, puisqu'on arrive à introduire la première modification voulue dans un gène cloné choisi et à trouver l'effet de cette mutation sur la fonction de ce gène. C'est ce qu'on appelle la **génétique inverse**, car on commence ici par introduire une mutation dans un gène, puis on détermine l'effet physiologique produit. C'est dans l'étude de l'expression et du fonctionnement des gènes d'eucaryotes qu'on s'est aperçu de la puissance que représente l'introduction d'une mutation particulière dans un ADN cloné (**mutagenèse *in vitro***).

On peut modifier un gène cloné par maints procédés de mutagenèse *in vitro*, qui y introduisent des délétions, des insertions ou des remplacements ponctuels de bases. On obtient par exemple souvent des délétions en découpant un ADN plasmidien par une endonucléase de restriction qui clive en un seul endroit de la molécule (figure 3.40) ; une fois ouverte, on traite cette dernière par une endonucléase qui grignote l'ADN aux deux bouts. On ressoude ensuite cet ADN digéré, pour produire une série de plasmides refermés porteurs de délétions au voisinage du site de restriction utilisé au départ pour ouvrir la molécule. On peut cloner et séquencer ces ADN porteurs de délétions, de façon à mesurer l'étendue de la délétion propre à chacun des plasmides de la série. Pour apprécier les conséquences de telle ou telle délétion, il reste à introduire le plasmide correspondant dans une culture de cellules.

La mutagenèse par délétion donne quelque idée du rôle fonctionnel que joue une région donnée d'un gène cloné, idée d'autant plus précise qu'on emploie des méthodes qui modifient des zones de plus en plus petites de la molécule d'ADN, par exemple en utilisant des oligonucléotides synthétiques pour générer des mutations ponctuelles dans la séquence d'un ADN (figure 3.41). L'oligonucléotide synthétique contenant la base mutée sert ici d'amorce à la synthèse d'ADN ; on isole et caractérise alors les molécules d'ADN néoformées, qui portent la mutation. On choisit ainsi l'acide aminé qu'on désire remplacer dans une protéine afin de connaître son rôle dans le fonctionnement de la protéine.

Ces exemples préfigurent seulement le grand nombre de méthodes dont nous disposons pour modifier à volonté la séquence d'un gène cloné ; veut-on connaître l'influence de telle ou telle mutation sur l'expression et la fonction de ce gène, il suffit alors de l'introduire dans le type de cellule approprié. La mutagenèse *in vitro* permet donc à présent au biologiste de préciser le rôle fonctionnel des séquences tant régulatrices que codantes de n'importe quel gène cloné.

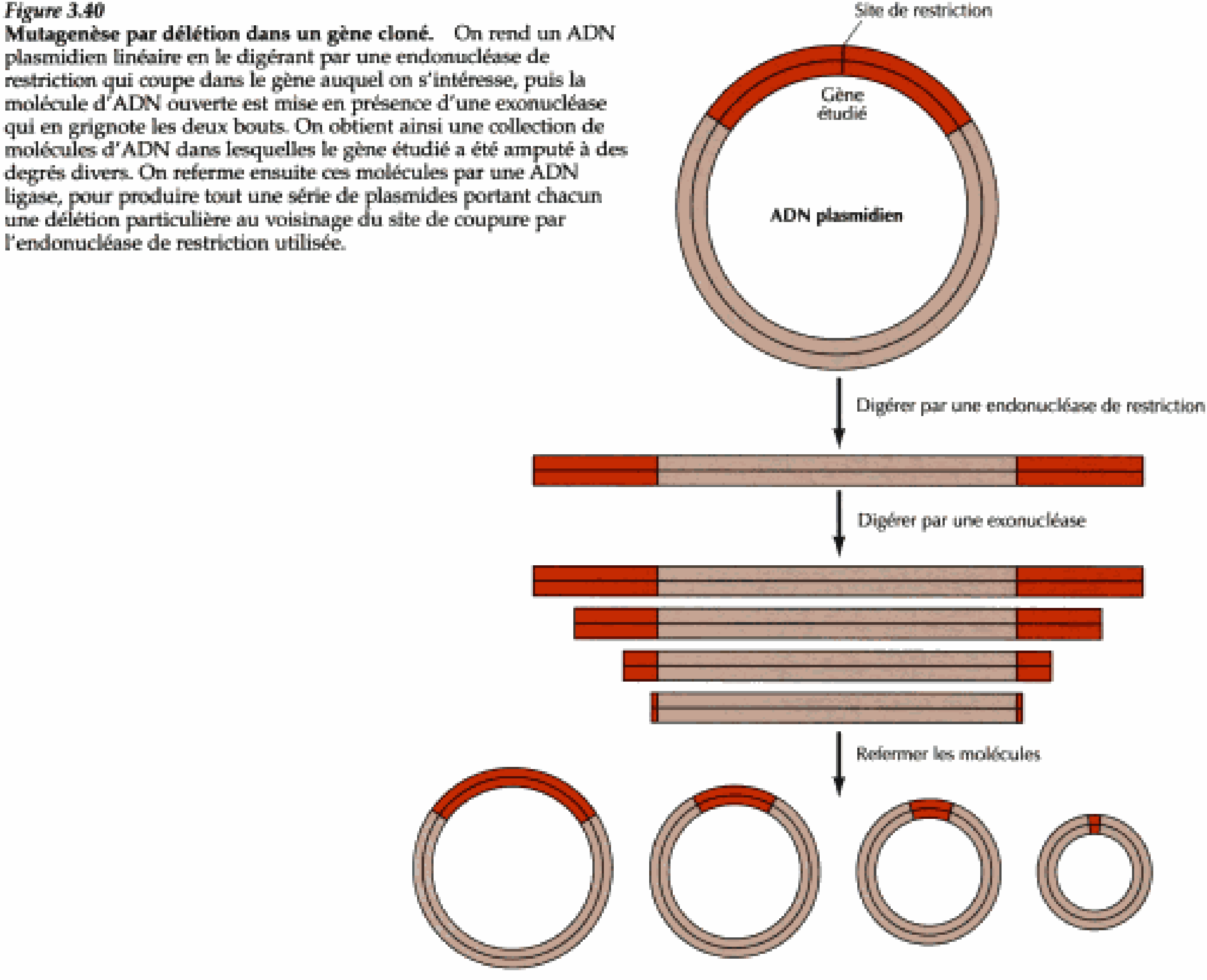


Figure 3.40
Mutagenèse par délétion dans un gène cloné. On rend un ADN plasmidien linéaire en le digérant par une endonucléase de restriction qui coupe dans le gène auquel on s'intéresse, puis la molécule d'ADN ouverte est mise en présence d'une exonucléase qui en grignote les deux bouts. On obtient ainsi une collection de molécules d'ADN dans lesquelles le gène étudié a été amputé à des degrés divers. On referme ensuite ces molécules par une ADN ligase, pour produire tout une série de plasmides portant chacun une délétion particulière au voisinage du site de coupure par l'endonucléase de restriction utilisée.

Comment muter à volonté un gène cellulaire

Bien que le transfert d'un gène cloné (de préférence si on le mute *in vitro*) à une cellule soit une méthode clé pour étudier la structure et le rôle de ce gène, cette voie échoue complètement quand on veut savoir le rôle que joue un gène inconnu dans une cellule ou chez un organisme donnés. Les cellules qu'on veut transfecter avec un gène cloné déterminé possèdent d'habitude déjà des exemplaires normaux de ce gène dans leur ADN chromosomique et ces exemplaires normaux continuent de fonctionner dans la cellule. Pour juger de l'effet physiologique du gène cloné, on doit donc annuler l'influence des exemplaires normaux du gène cellulaire correspondant. Comme on va le montrer, on y arrive facilement chez la levure, mais bien plus difficilement dans les cellules de mammifère, encore qu'on dispose à présent de diverses stratégies consistant soit à inactiver les exemplaires chromosomiques du gène cloné, soit à invalider la fonction normale du gène.

Il est assez facile de muter un gène d'un chromosome de levure, car l'ADN introduit dans une cellule de levure subit de fréquentes **recombinaisons homologues** avec l'exemplaire chromosomique correspondant (figure 3.42). Dans une recombinaison homologue, le gène de levure cloné

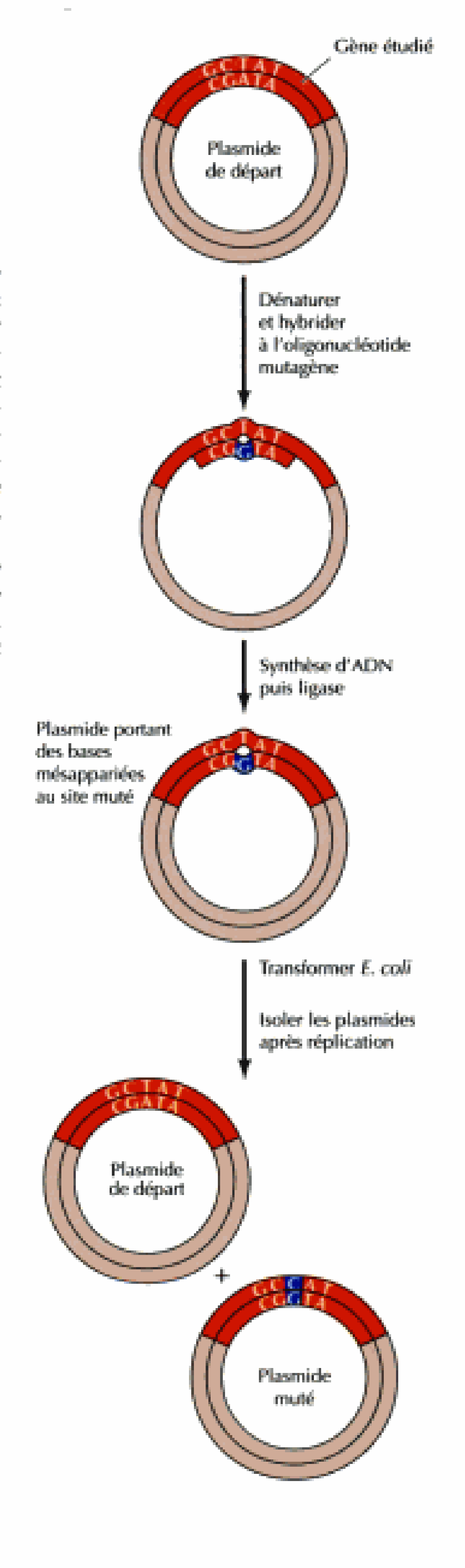
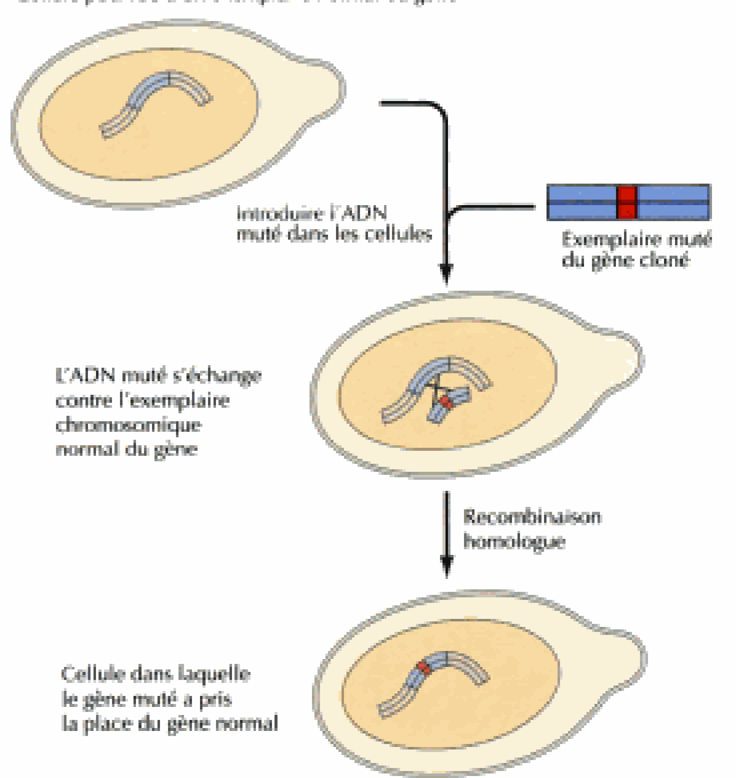


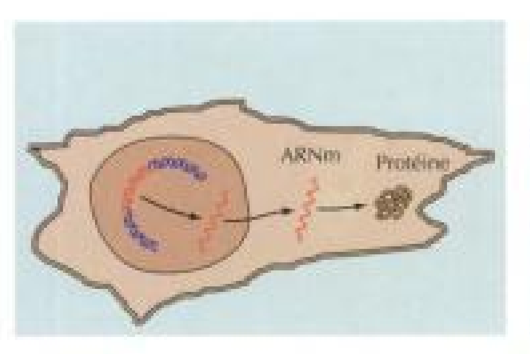
Figure 3.41
Mutagenèse à l'aide d'oligonucléotides de synthèse. L'oligonucléotide possédant la base modifiée sert à amorcer la synthèse d'ADN sur l'ADN plasmidien, puis on referme cet ADN en présence d'une ADN ligase. Cette méthode fournit des plasmides dont un brin possède la base normale et l'autre brin la base mutée. Après transformation de *E. coli* par ces plasmides, leur réplication produit un mélange de plasmides moitié normaux, moitié mutés.

prend la place d'un allèle normal : toute mutation imposée *in vitro* au gène cloné s'incorpore à l'exemplaire chromosomique de ce gène de levure ; dans le cas le plus simple, ce gène normal fera place au gène cloné porteur des mutations invalidantes, de sorte qu'on va découvrir sa fonction physiologique. Comme le cycle d'une levure passe de l'état haploïde à l'état diploïde, on arrive même à étudier, par inactivation, les gènes indispensables à la prolifération de la cellule ; dans ce but, on introduit un exemplaire inactivé du gène dans la cellule diploïde, qui possède alors un exemplaire normal et un exemplaire inactif du gène étudié. On induit la méiose dans ces cellules et on observe l'influence qu'exerce le gène inactivé sur les cellules filles haploïdes.

Malheureusement, l'ADN transféré à des cellules de mammifère se recombine rarement au gène chromosomique homologue, de sorte que cette approche est beaucoup moins efficace qu'elle n'est chez la levure, peut-être à cause de la différence de taille entre les génomes de levure et

Figure 3.42
Inactivation de gène par recombinaison homologue. Dans une cellule, on introduit un exemplaire muté d'un gène cloné . Par recombinaison homologue, ce gène muté peut venir prendre la place d'un exemplaire du gène normal, pour donner une cellule possédant la mutation désirée dans son ADN chromosomique.





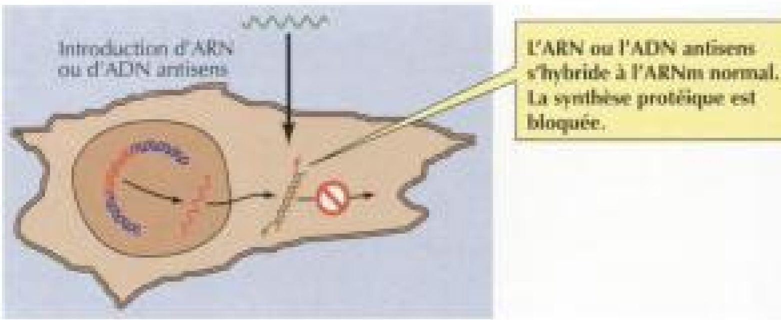
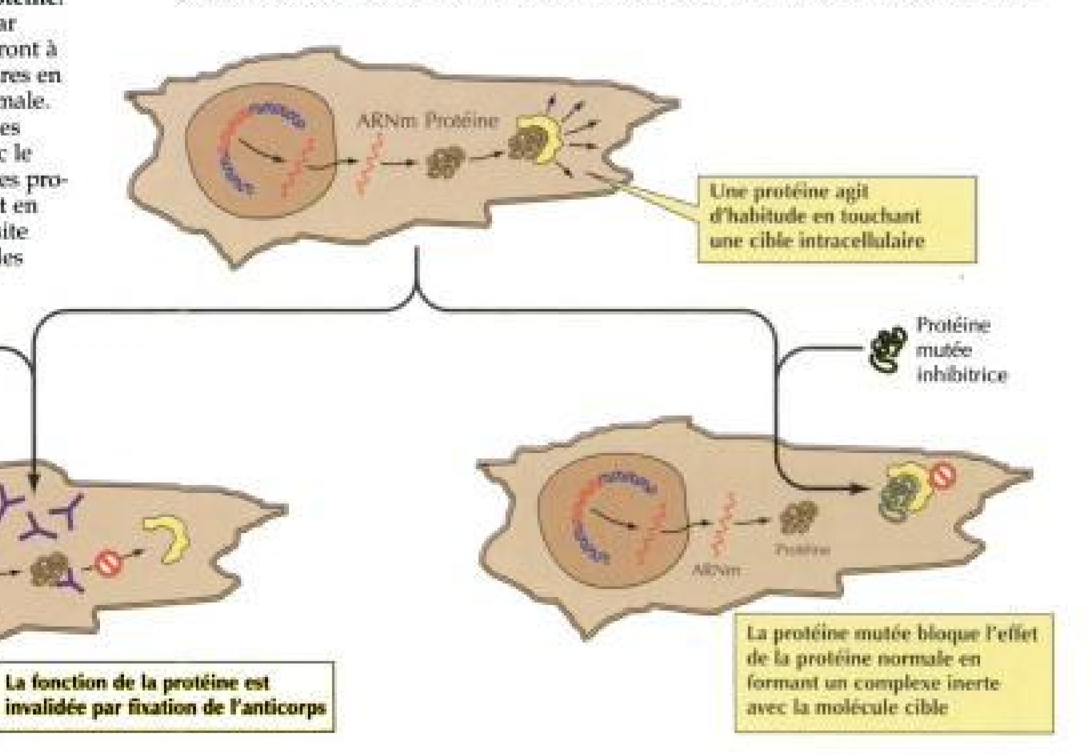


Figure 3.43
Inhibition de l'expression d'un gène par un ARN ou un ADN antisens. L'ARN ou l'ADN monocaténaire antisens est complémentaire de l'ARNm du gène auquel on s'intéresse ; aussi va-t-il former un hybride avec l'ARNm cible et empêcher que cet ARNm soit traduit en protéine.

ceux de mammifère, où l'ADN introduit a tendance à s'intégrer au hasard dans le génome de la cellule transfectée, en se recombinant à la première venue des séquences rencontrées. Cependant, on a mis au point plusieurs procédés pour sélectionner les cellules transformées dans lesquelles une recombinaison homologue s'est passée et inactiver ainsi des gènes de mammifère. Une application majeure est celle qui consiste à inactiver ou désintégrer un gène donné de cellules souches embryonnaires en culture ; puisque (on l'a décrit ci-avant) les cellules ES servent à obtenir des animaux transgéniques, on saura donc en quoi l'inactivation d'un gène touche les diverses fonctions d'un organisme supérieur. Ces travaux se sont révélés cruciaux quand on s'est mis à étudier le rôle des gènes commandant le développement embryonnaire de la souris.

Au lieu d'inactiver un gène par recombinaison homologue, on se sert aussi d'**acides nucléiques antisens** pour bloquer l'expression d'un gène donné (figure 3.43). Ici, on introduit dans une cellule l'ARN ou l'ADN monocaténaire complémentaire (antisens) à l'ARNm du gène auquel on s'intéresse ; ces molécules antisens s'hybrident à l'ARNm et empêchent qu'il soit traduit en protéine ; d'ailleurs, les hybrides ARN-ADN formés à la suite de l'entrée des molécules d'ADN antisens sont d'habitude détruites par la cellule. On arrive à introduire directement de l'ARN antisens en l'in-

Figure 3.44
Inhibition directe du fonctionnement d'une protéine. Des anticorps introduits par micromanipulation se fixeront à certaines protéines cellulaires en inhibant leur fonction normale. En outre, certaines protéines mutées vont interférer avec le fonctionnement de certaines protéines normales, en entrant en compétition avec elles au site récepteur de leurs molécules cibles.



jectant dans la cellule avec une micro-aiguille ; sinon, on transfecte la cellule avec un vecteur programmé pour synthétiser un ARN antisens. L'ADN antisens consiste d'habitude en courts oligodésoxynucléotides (d'environ 20 pb) que l'on injecte dans la cellule ou que l'on ajoute au milieu de culture, puisque ces petites molécules pénètrent assez facilement dans la cellule.

Au lieu d'inactiver un gène ou d'empêcher que son ARNm ne soit traduit, il est possible d'interférer directement dans la cellule avec la fonction remplie par la protéine codée (figure 3.44). Pour ce faire, on y injecte des anticorps qui bloquent l'activité de la protéine contre laquelle ils sont dirigés. On sait d'autre part que certaines protéines mutées interfèrent avec la fonction de la protéine normale correspondante quand toutes deux s'expriment dans la même cellule, probablement par leur compétition pour une même molécule cible ; il suffit d'introduire par transfert de gène les ADN clonés codant ces protéines mutées (appelées **mutants inhibiteurs dominants**) pour examiner ce qui se passe quand on empêche un gène normal de fonctionner.

Résumé

HÉRÉDITÉ, GÈNES ET ADN

Gène et chromosome : Le chromosome est le dépositaire des gènes.

Gène et enzyme : Un gène spécifie la séquence d'acides aminés d'une chaîne polypeptidique.

Identification de l'ADN au matériau génétique : On identifia l'ADN au matériau génétique par des expériences de transformation bactérienne.

Structure de l'ADN : L'ADN est une hélice double dans laquelle des liaisons hydrogène relient chaque purine d'un brin à une pyrimidine du brin opposé. Grâce à un appariement strict — de A avec T et de G avec C — la séquence de l'un est complémentaire de celle de l'autre.

Réplication de l'ADN : L'ADN se réplique de manière semi-conservatoire : les deux brins se séparent et chacun sert de matrice pour la synthèse d'un brin fils.

EXPRESSION DE L'INFORMATION GÉNÉTIQUE

Colinéarité d'un gène avec sa protéine : L'ordre des nucléotides d'un ADN spécifie l'ordre des acides aminés de sa protéine.

Rôle de l'ARN messager : L'ARN messager est l'intermédiaire qui relaie l'information portée par l'ADN jusqu'au ribosome, où l'information sert de matrice pour la synthèse de la protéine.

Le code génétique : Les ARN de transfert servent d'adaptateurs entre les acides aminés et les ARNm au cours de la traduction. Chaque acide aminé est spécifié par un codon formé de trois nucléotides.

Virus à ARN et transcription inverse : Comme on l'a découvert chez les rétrovirus, des matrices d'ARN servent parfois à la synthèse d'ADN.

ADN RECOMBINANT

Endonucléases de restriction : les endonucléases de restriction coupent dans des séquences d'ADN singulières en donnant des fragments moléculaires typiques.

MOTS CLÉ

gène, allèle, dominant, récessif, génotype, phénotype, chromosome, diploïde, méiose, haploïde, mutation, recombinaison, carte génétique

principe d'un gène pour chaque enzyme

transformation

réplication semi-conservatoire, ADN polymérase

postulat central, transcription, traduction, ARN messager (ARNm), ARN polymérase, ARN ribosomial (ARNr), ARN de transfert (ARNt)

code génétique, traduction *in vitro*, codon

rétrovirus, transcription inverse, transcriptase inverse

endonucléase de restriction, électrophorèse en gel, carte de restriction

clonage moléculaire, vecteur, molécule recombinante (née), clone moléculaire, ADN ligase, ADNc

Production de molécules d'ADN recombinant : Une molécule d'ADN recombinant comporte le fragment d'ADN intéressant, soudé à un vecteur capable de se répliquer de façon indépendante dans une cellule hôte appropriée.

plasmide, origine de réplication, cosmide, chromosome artificiel de levure (YAC)

Vecteurs utilisés pour recombiner un ADN : On choisit les vecteurs selon la taille du fragment d'ADN à cloner.

Séquençage selon Maxam et Gilbert, autoradiographie, séquençage selon Sanger, didésoxynucléotide

Séquençage d'ADN : On trouve aisément la séquence nucléotidique d'un fragment d'ADN cloné.

vecteur d'expression, baculovirus

Expression d'un gène cloné : On exprime activement la protéine d'un gène cloné en introduisant celui-ci dans des bactéries ou dans des cellules d'eucaryotes.

amplification exponentielle par la polymérase (PCR)

Amplification exponentielle d'un ADN en présence de polymérase : La méthode PCR permet d'amplifier et d'isoler *in vitro* n'importe quel fragment d'ADN.

DÉTECTION D'UN ACIDE NUCLÉIQUE OU D'UNE PROTÉINE

hybridation d'acide nucléique, sonde, transfert Southern, transfert Northern, hybridation *in situ*

Hybridation d'un acide nucléique : L'hybridation d'un acide nucléique permet de retrouver une séquence particulière d'un ADN ou d'un ARN.

Détection de traces d'ADN ou d'ARN par la méthode PCR : La méthode PCR est assez sensible pour déceler de petites quantités d'une molécule d'ADN ou d'ARN particulière.

anticorps, antigène, anticorps monoclonal, immunotransfert, transfert Western, immunoprécipitation, électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS (SDS-PAGE)

Anticorps comme sonde pour chercher une protéine : Un anticorps sert de sonde pour détecter une protéine déterminée dans une cellule ou dans un extrait cellulaire.

banque d'ADN recombinants, banque d'ADN génomiques, banque d'ADNc

Sondes pour cribler une banque d'ADN recombinants : Pour retrouver un insert d'ADN singulier au sein d'une banque d'ADN recombinants, on utilise des sondes d'hybridation d'acide nucléique ou des sondes protéiques.

FONCTION DES GÈNES D'EUCARYOTES

mutant thermosensible

Analyse génétique des levures : La génétique rudimentaire et la prolifération rapide d'une levure facilitent le clonage moléculaire d'un gène portant n'importe quelle mutation connue.

transfert de gène, transfection, expression transitoire, liposome, électroporation, souris transgénique, cellules souches embryonnaires (ES), plasmide Ti

Transfert de gène chez les plantes et les animaux : On examine le rôle physiologique d'un gène cloné en l'introduisant dans une cellule ou dans un organisme d'eucaryote supérieur.

génétique inverse, mutagenèse *in vitro*

Mutagenèse d'ADN clonés : La mutagenèse *in vitro* d'un ADN cloné sert à examiner l'influence de telle ou telle mutation sur la fonction d'un gène.

recombinaison homologue, acides nucléiques antisens, mutant inhibiteur dominant

Muter à volonté un gène cellulaire : On sait introduire une mutation dans l'exemplaire chromosomique d'un gène *via* une recombinaison homologue avec une séquence d'ADN clonée. De plus, on peut bloquer l'expression ou le fonctionnement du produit d'un gène donné à l'aide d'acides nucléiques antisens ou de mutants inhibiteurs dominants.

QUESTIONNAIRE

1. Quelle est la carte génétique d'un locus comportant les gènes *x*, *y* et *z*, si la fréquence de recombinaison est de 0,5 % entre *x* et *z*, de 0,2 % entre *x* et *y* et de 0,7 % entre *y* et *z* ?

2. Le site actif de votre enzyme comporte une cystéine codée par le codon UGU. En quoi une mutation de la troisième base en un C modifierait-elle le fonctionnement de l'enzyme ? Qu'arriverait-il si on la mutait en un A ?

3. Quand on traite une molécule d'ADN de 4 kb par *Eco*RI, on obtient deux fragments, un de 1 kb, l'autre de 3 kb. En digérant la même molécule par *Hin*dIII, on obtient de fragments de 1,5 et 2,5 kb. En digérant par les deux enzymes à la fois, on obtient des fragments de 0,5, 1,0 et 2,5 kb. Dessinez la carte de restriction indiquant la place des coupures par *Eco*RI et *Hin*dIII.

4. En partant de l'ADN d'un seul spermatozoïde, combien obtiendra-t-on d'exemplaires d'une séquence génique particulière après 10 cycles d'amplification PCR ? et après 30 cycles ?

5. Vous avez cloné un ADNc de fonction inconnue. Comment procéder pour localiser la structure cellulaire où réside la protéine codée par cet ADNc ?

6. Vous désirez identifier les résidus d'acides aminés impliqués dans l'activité catalytique d'un enzyme. Si vous disposez d'un clone d'ADNc, quelle sera votre stratégie expérimentale ?

POUR EN SAVOIR PLUS

Références générales

Darnell, J., Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S.L. & Matsudaira, P. 1997. Biologie moléculaire de la cellule. De Boeck, Paris-Bruxelles.

Freifelder, D. 1987. *Molecular Biology*. 2nd ed. Boston: Jones and Bartlett.

Griffith, A. J. F., Miller, J. H., Suzuki, D. T., Lewontin, R. C. & Gelbart, W. M. 1997. *Introduction à l'analyse génétique*. Traduction de la 6e édition américaine. De Boeck, Bruxelles.

Lewin, B. *Gènes IV*. Traduction de la 6e édition anglaise. 1998, De Boeck, Bruxelles.

Watson, J. D., Gilman M., Witkowski J., & Zoller M. 1994. *ADN recombinant*. Traduction de la 2e édition américaine. De Boeck, Bruxelles.

Watson, J. D., Hopkins N. H., Roberts J. W., Steitz J. A., & Weiner A. M.. 1989. *Biologie moléculaire du gène*. Traduction de la 4e édition américaine. InterEditions, Paris.

Heredité, gènes et ADN

Avery, O. T., C. M. MacLeod, and M. McCarty. 1944. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. *J. Exp. Med.* 79: 137–158. [P]

Franklin, R. E., and R. G. Gosling. 1953. Molecular configuration in sodium thymonucleate. *Nature* 171: 740–741. [P]

Kornberg, A. 1960. Biologic synthesis of deoxyribonucleic acid. *Science* 131: 1503–1508. [P]

Meselson, M. and F. W. Stahl. 1958. The replication of DNA in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 44: 671–682. [P]

Watson, J.D. and F. H. C. Crick. 1953. Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature* 171: 964–967. [P]

Watson, J.D. and F. H. C. Crick. 1953. Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171: 737–738. [P]

Wilkins, M. H. F., A. R. Stokes and H. R. Wilson. 1953. Molecular structure of deoxypentose nucleic acids. *Nature* 171: 738–740. [P]

Expression de l'information génétique

Baltimore, D. 1970. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* 226: 1209–1211. [P]

Brenner, S., F. Jacob and M. Meselson. 1961. An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis. *Nature* 190: 576–581. [P]

Crick, F. H. C., L. Barnett, S. Brenner, and R. J. Watts-Tobin. 1961. General nature of the genetic code for proteins. *Nature* 192: 1227–1232. [P]

Haseltine, W. 1997. Du gène au traitement (protéines à application thérapeutique). *Pour la Science* n° 235:28-33. [R]

Ingram, V. M. 1957. Gene mutations in human hemoglobin: The chemical difference between normal and sickle cell hemoglobin. *Nature* 180: 326–328. [P]

Millet, A. 1998. Des souris presque sur mesure : les souris kock-out. *La Recherche* n°311:52-53.

Nirenberg, M. and P. Leder. 1964. RNA codewords and protein synthesis. *Science* 145: 1399–1407. [P]

Nirenberg, M. W. and J. H. Matthaei. 1961. The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 47: 1588–1602. [P]

XYZ Immortalisation de cellules-souches embryonnaires humaines différenciables à volonté, cité dans *Nature* **396**, p. 104. 1998.

Temin, H. M. and S. Mizutani. 1970. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* 226: 1211–1213. [P]

Yanofsky, C., B. C. Carlton, J. R. Guest, D. R. Helinski and U. Henning. 1964. On the colinearity of gene structure and protein structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 51: 266–272. [P]

ADN recombinant

Arnheim, N. and H. Erlich. 1992. Polymerase chain reaction strategy. *Ann. Rev. Biochem.* 61: 131–156. [R]

Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl. eds. 1989. *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: Greene Publishing and Wiley Interscience. [R]

Burke, D. T., G. F. Carle and M. V. Olson. 1987. Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors. *Science* 236: 806–812. [P]

Cohen, S. N., A. C. Y. Chang, H. W. Boyer and R. B. Helling. 1973. Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70: 3240–3244. [P]

Delpech, M. 1992. Les applications de la PCR : un nouvel outil pour le diagnostic médical. *La Recherche* n°249:1462.

Glick, B. R. and J. J. Pasternak. 1994. *Molecular Biotechnology. Principles and Applications of Recombinant DNA.* Washington, D. C.: ASM Press.

Hames, B. D. and D. Glover. eds. 1995. *DNA Cloning. A Practical Approach.*Oxford, England: IRL Press.

Maxam, A. M. and W. Gilbert. 1977. A new method for sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 560–564. [P]

McPherson, M. J., B. D. Hames, and G. Taylor. eds. 1995. *PCR. A Practical Approach.* Oxford, England: IRL Press.

Nathans, D. and H. O. Smith. 1975. Restriction endonucleases in the analysis and restructuring of DNA molecules. *Ann. Rev. Biochem.* 44: 273–293. [R]

Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis and H. A. Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487–491. [P]

Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual,* 2d ed. Plainview, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463–5467. [P]

Détection des acides nucléiques et des protéines

Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl. eds. 1989. *Current Protocols in Molecular Biology.* New York: Greene Publishing and Wiley Interscience.

Benton, W. D. and R. W. Davis. 1977. Screening λgt recombinant clones by hybridization to single plaques *in situ.* *Science* 196: 180–182. [P]

Broome, S. and W. Gilbert. 1978. Immunological screening method to detect specific translation products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 2746–2749. [P]

Caruthers, M. H. 1985. Gene synthesis machines: DNA chemistry and its uses. *Science* 230: 281–285. [R]

Grunstein, M. and D. S. Hogness, 1975. Colony hybridization: A method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72: 3961–3965. [P]

Harlow, E. and D. Lane. 1988. *Antibodies: A Laboratory Manual.* Plainview, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Kohler, G. and C. Milstein. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495–497. [P]

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685. [P]

Maniatis, T., R. C. Hardison, E. Lacy, J. Lauer, C. O'Connell, D. Quon, G. K. Sim and A. Efstratiadis. 1978. The isolation of structural genes from libraries of eucaryotic DNA. *Cell* 15: 687–701. [P]

Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual,* 2nd ed. Plainview, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Schildkraut, C. L., J. Marmur and P. Doty. 1961. The formation of hybrid DNA molecules, and their use in studies of DNA homologies. *J. Mol. Biol.* 3: 595–617. [P]

Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503–517. [P]

Fonction des gènes d'eucaryotes

Botstein, D. and D. Shortle. 1985. Strategies and applications of *in vitro* mutagenesis. *Science* 229: 1193–1201. [R]

Bronson, S. K. and O. Smithies. 1994. Altering mice by homologous recombination using embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* 269: 27155–27158. [R]

Capecchi, M. R. 1989. Altering the genome by homologous recombination. *Science* 244: 1288–1292. [R]

Gasser, C. S. and R. T. Fraley. 1989. Genetically engineering plants for crop improvement. *Science* 244: 1293–1299. [R]

Gordon, J. W., G. A. Scangos, D. J. Plotkin, J. A. Barbosa, and F. H. Ruddle. 1980. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 7380–7384. [P]

Herskowitz, I. 1987. Functional inactivation of genes by dominant negative mutations. *Nature* 329: 219–222. [R]

Horsch, R. B., J. E. Fry, N. L. Hoffmann, D. Eichholtz, S. G. Rogers and R. T. Fraley. 1985. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227: 1229–1231. [P]

Izant, J. G. and H. Weintraub. 1984. Inhibition of thymidine kinase gene expression by antisense RNA: A molecular approach to genetic analysis. *Cell* 36: 1007–1015. [P]

Jaenisch, R. 1988. Transgenic animals. *Science* 240: 1468–1474. [R]

Joyner, A. L., ed. 1993. *Gene Targeting. A Practical Approach.* Oxford, England: IRL Press.

Kaiser, C., S. Michaelis and A. Mitchell. 1994. *Methods in Yeast Genetics: A Laboratory Course Manual.* Plainview, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Kuhn, R., F. Schwenk, M. Aguet and K. Rajewsky. 1995. Inducible gene targeting in mice. *Science* 269: 1427–1429. [P]

Maliga, P., D. F. Klessig, A. R. Cashmore, W. Gruissem and J. E. Varner. eds. 1994. *Methods in Plant Molecular Biology: A Laboratory Course Manual.* Plainview, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Palmiter, R. D. and R. L. Brinster. 1986. Germ-line transformation of mice. *Ann. Rev. Genet.* 20: 465–499. [R]

Robertson, E., A. Bradley, M. Kuehn and M. Evans. 1986. Germline transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector. *Nature* 323: 445–448. [P]

Smith, M. 1985. *In vitro* mutagenesis. *Ann. Rev. Genet.* 19: 423–462. [R]

Struhl, K. 1983. The new yeast genetics. *Nature* 305: 391–397. [R]

Thomas, K. R. and M. R. Capecchi, 1987. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 51: 503–512. [P]

Wagner, R. W. 1994. Gene inhibition using antisense oligonucleotides. *Nature* 372: 333–335. [R]

Wigler, M., R. Sweet, G. K. Sim, B. Wold, A. Pellicer, E. Lacy, T. Maniatis, S. Silverstein and R. Axel. 1979. Transformation of mammalian cells with genes from prokaryotes and eukaryotes. *Cell* 16: 777–785. [P]



Water jar, Zuni, 1880

2e PARTIE

Flux de l'information génétique

4. *Agencement des génomes cellulaires*
5. *Réplication, surveillance et réarrangements de l'ADN génomique*
6. *Synthèse et maturation des ARN*
7. *Synthèse et remaniements des protéines ; régulation de leur formation*

4

Agencement des génomes cellulaires

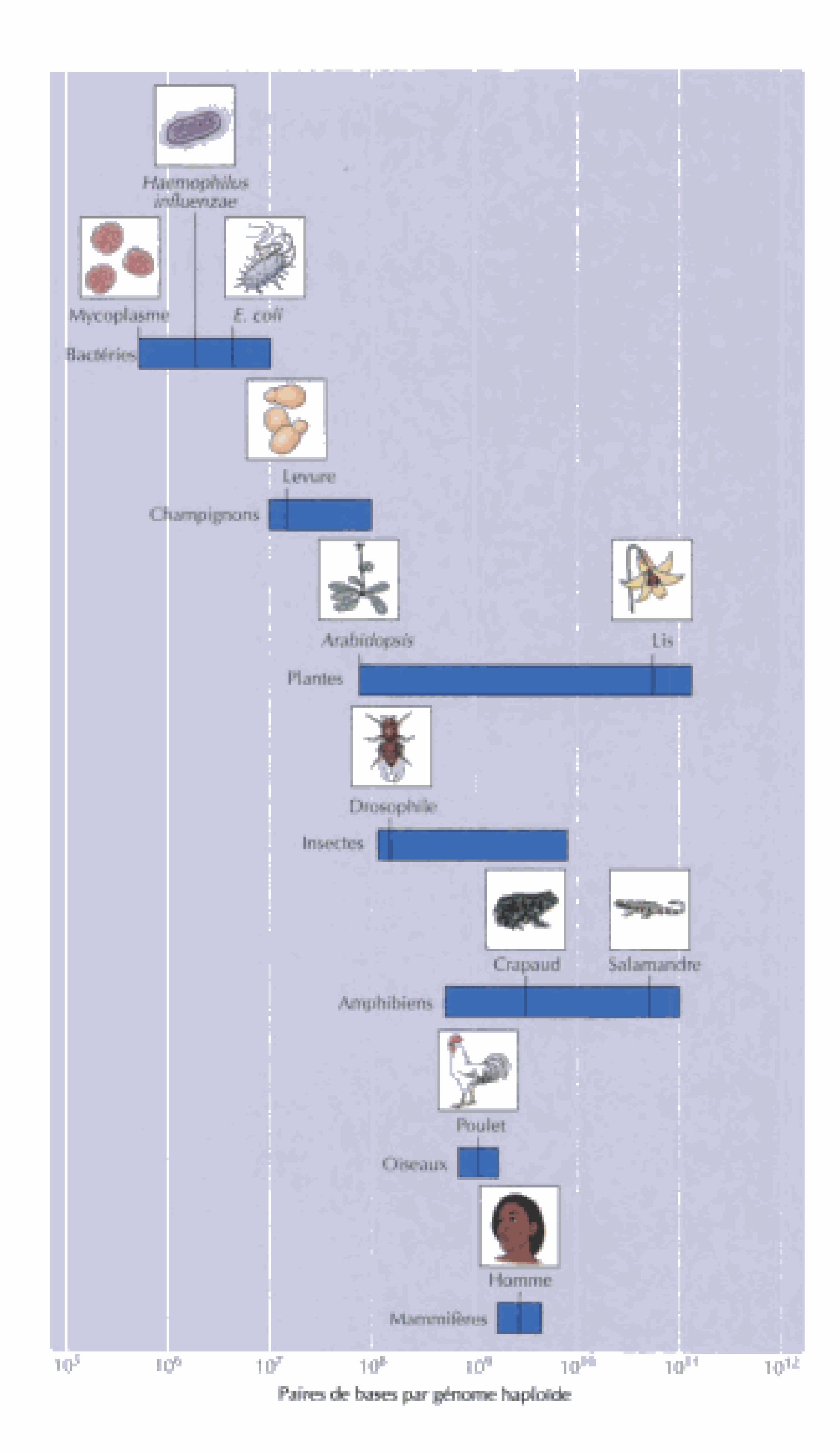
En tant que bagage génétique, l'ADN sert de matrice pour régler toutes les activités cellulaires et commander le programme de développement embryonnaire de tous les organismes pluricellulaires. Pour bien saisir la biologie moléculaire de la cellule, il faut absolument connaître la structure et le fonctionnement des gènes. Une étape clé de cette entreprise fut la mise au point du clonage de gène, qui permit aux chercheurs de disséquer des génomes eucaryotiques complexes et de vérifier la fonction de leurs gènes. Grâce aux avancées continuelles de la méthodologie de l'ADN recombinant, nous en sommes arrivés à l'étape passionnante qui nous fait accéder aux séquences de génomes entiers, source d'une approche nouvelle pour élucider les bases génétiques du comportement cellulaire.

Comme on l'a montré au chapitre 3, le fait de pouvoir recombiner des molécules d'ADN a d'abord permis d'isoler et d'examiner tel ou tel gène. Durant ces quelques dernières années, on a abouti à l'approche plus globale qui consiste à séquencer des génomes entiers, non seulement de bactérie ou de levure, mais aussi de génomes plus volumineux, comme ceux des plantes ou des animaux, l'Homme y compris. Plusieurs programmes de séquençage sont en cours d'exécution et apportent les premiers fruits des efforts consentis ; on doit s'attendre à ce que le séquençage soutenu de certains génomes fournisse une riche moisson d'informations, notamment l'identification de nombreux gènes jusqu'alors insoupçonnés. Les résultats de ces projets de séquençage de génome vont sans aucun doute stimuler pendant de nombreuses années la recherche en biologie moléculaire et cellulaire ; ils auront un impact marquant sur notre compréhension de nombreuses maladies humaines congénitales.

COMPLEXITÉ DES GÉNOMES D'EUCARYOTES

Les génomes de la plupart des eucaryotes sont plus grands et plus complexes que ceux des procaryotes (figure 4.1). Ce fait n'est pas surprenant en soi, car on doit s'attendre à trouver plus de gènes chez des organismes plus complexes, mais la taille du génome de beaucoup d'eucaryotes ne semble pas en rapport avec leur complexité génétique : le génome de la salamandre

Figure 4.1
Taille des génomes. On a porté en échelle logarithmique l'ordre de grandeur de la taille des génomes de groupes d'organismes typiques.



et celui du lis contiennent au moins dix fois plus d'ADN que le génome humain, bien que ces organismes ne soient évidemment pas dix fois plus complexes que l'Homme.

Ce paradoxe fut résolu quand on découvrit que les gènes de la plupart des cellules eucaryotes comportent, à côté des gènes fonctionnels, une masse de séquences d'ADN dépourvues du pouvoir de coder des protéines. La différence de taille entre le génome de la salamandre et celui de l'Homme reflète donc la présence de plus d'ADN non codant et non d'un

plus grand nombre de gènes dans le génome de la salamandre. C'est un trait général du génome des eucaryotes complexes que de posséder une grande quantité de séquences non codantes : le facteur de mille qui différencie la taille du génome de humain de celui de *E. coli* n'est pas seulement dû à son plus grand nombre de gènes ; on pense que le génome humain comporte environ 100 000 gènes, soit 25 fois le nombre de gènes de *E. coli*. La complexité des génomes d'eucaryotes provient donc en grande partie de l'abondance de plusieurs types de séquences non codantes, qui constituent la majeure partie de l'ADN des cellules des eucaryotes supérieurs.

Introns et exons

Au point de vue moléculaire, un gène est un tronçon d'ADN qui s'exprime en donnant un produit doué de fonction, à savoir soit un ARN (par exemple, ribosomial ou de transfert), soit un polypeptide. Une partie de l'ADN non codant des eucaryotes forme de longues séquences d'ADN placées entre les gènes (**séquences espaceur**), mais on trouve aussi beaucoup d'ADN non codant à l'intérieur de la plupart des gènes d'eucaryotes ; ces gènes sont morcelés en ce sens que des séquences codantes (**exons**) y sont séparées par des séquences non codantes (séquences interposées, ou **introns**) (figure 4.2). Un gène de ce type est transcrit d'un bloc en une longue molécule d'ARN, puis les introns en sont éliminés par excision-épissage, de sorte qu'on ne retrouve que les seuls exons dans l'ARN messager. Bien que la majorité des introns semblent dénués de fonction, ils comptent pour une fraction non négligeable de l'ADN des génomes d'eucaryotes supérieurs.

En 1977, les groupes de Phillip Sharp et de Richard Roberts ont découvert indépendamment l'un de l'autre l'existence des introns, en étudiant la réplication d'un adénovirus en culture de cellules humaines. L'adénovirus est le modèle de choix de l'expression d'un gène, parce que son génome ne comporte que $3,5 \times 10^4$ paires de bases et que les ARNm correspondants sont produits en abondance dans la cellule infectée. Ces chercheurs choisirent de caractériser les ARNm de l'adénovirus en localisant les gènes viraux correspondants par observation des hybrides ARN-ADN au microscope électronique : le fait que les hybrides ARN-ADN se distinguent de l'ADN monocaténaire permet de trouver la place des transcrits sur une molécule d'ADN. Ils virent avec étonnement qu'une molécule d'ARNm d'adénovirus ne s'hybride pas à une seule, mais à plusieurs zones, éparses, du génome viral (figure 4.3). Un ARNm d'adénovirus ne correspond donc pas à un transcrit ininterrompu de la matrice d'ADN, il est au contraire assemblé à partir de plusieurs tronçons de séquence distincts, issus de régions différentes de l'ADN viral. On montra ensuite que cela provient d'un événement **d'excision-épissage** de l'ARN, décrit en détail au chapitre 6.

À peine avait-on décrit les introns de l'adénovirus qu'on en trouvait aussi dans des gènes clonés de cellules eucaryotes : en observant les hybrides ARN-ADN du gène de globine au microscope électronique, puis

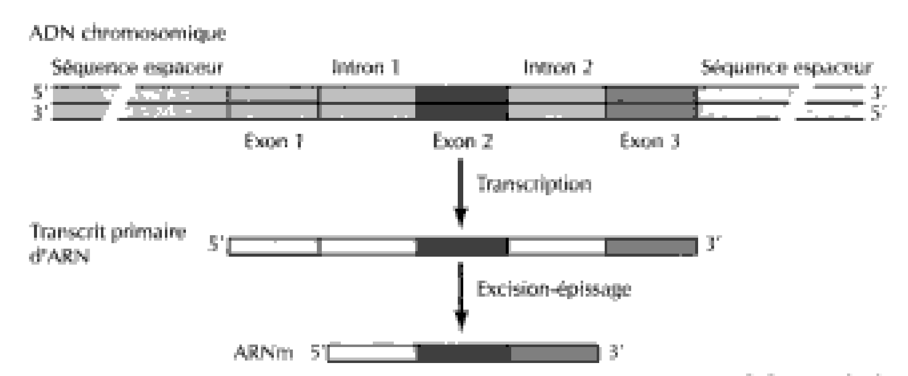


Figure 4.2
Structure d'un gène d'eucaryote. La plupart des gènes d'eucaryote contiennent des segments de séquences codantes (exons) séparés par des tronçons de séquences non codantes (introns). Exons et introns sont transcrits de l'ADN en un long transcrit primaire d'ARN ; les introns sont ensuite éliminés par excision-épissage pour former l'ARNm mature.

EXPÉRIENCE CLÉ



Découverte des introns

Fragments excisés au bout 5' de l'ARNm tardif de l'adénovirus 2

Susan M. Berget, Claire Moore, et Phillip A. Sharp
Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Massachusetts

Proceedings of the National Academy of Sciences USA, Volume 74, 1977, pages 3171–3175

Contexte

Avant d'effectuer le clonage moléculaire, on savait bien peu de choses de la synthèse des ARNm dans les cellules d'eucaryotes, sinon qu'elle y était bien plus complexe que chez les bactéries. On s'aperçut que la synthèse des ARNm d'eucaryotes exigeait non seulement la transcription, mais encore des réactions de maturation qui modifient la structure des transcrits primaires. Il semblait notamment que les ARNm d'eucaryotes étaient synthétisés sous forme de longs transcrits primaires, localisés au noyau, qui étaient ensuite scindés en petites molécules d'ARNm, exportées dans le cytoplasme.

Ces étapes de maturation paraissaient mettre en jeu l'élagage des bouts 3' et 5' des transcrits primaires ; dans ce modèle, les ARNm englobés dans de longs transcrits primaires auraient alors été codés par des séquences d'ADN ininterrompues. Cette conception des ARNm d'eucaryote fut complètement abandonnée lorsque Berget, Moore et Sharp d'une part, Chow, Gelinas, Broker et Roberts d'autre part, décrivirent le processus d'excision-épissage (Un surprenant remaniement de séquence au bout 5' de l'ARN messager de l'adénovirus 2, *Cell* **12** :1-8, 1977).

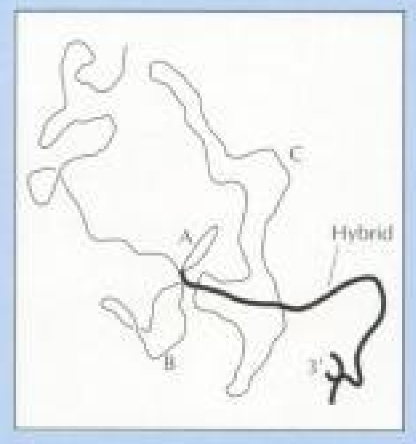
Preuve expérimentale

Les laboratoires qui mirent l'excision-épissage en évidence utilisaient tous deux l'adénovirus 2 pour étudier la synthèse d'ARNm dans les cellules humaines ; ce virus était choisi comme modèle parce que beaucoup plus simple que sa cellule hôte. On isole ainsi directement l'ADN des virions ; les ARNm codant les protéines virales de structure se trouvent en quantité telle qu'on les purifie directement à partir des cellules infectées. Berget, Moore et Sharp choisirent un ARNm abondant codant pour le polypeptide de structure capsidaire appelé hexon.

Pour positionner l'ARNm de cet hexon sur le génome viral, ils hybridèrent l'ARNm purifié à l'ADN de l'adénovirus et observèrent les molécules hybrides au microscope électronique. Comme on devait s'y attendre, le corps de l'ARNm de l'hexon s'hybridait aux fragments de restriction de l'ADN viral connus pour coder le gène de l'hexon, mais les séquences du bout 5' de l'ARNm de l'hexon ne s'hybridaient pas aux séquences d'ADN bordant celles qui codaient le corps du message : on pouvait donc imaginer que le bout 5' de l'ARNm provenait de séquences situées dans une autre partie du génome viral.

Pour prouver cette hypothèse, ces chercheurs hybridèrent l'ARNm de l'hexon à un fragment de restriction s'étendant en amont du gène de l'hexon ; les hybrides ARNm-ADN formés dans cette expérience apparurent sous forme d'une structure en boucle complexe (voir figure) : le corps de l'ARNm formait un grand tronçon hybride avec les séquences d'ADN connues pour coder l'hexon, mais, fait surprenant, le bout 5' de l'ARNm de l'hexon s'hybridait à trois petites régions d'ADN d'amont, séparées tant l'une de l'autre que du corps du message par de grandes boucles d'ADN monocaténaire. Les séquences du bout 5' de l'ARNm de l'hexon devaient donc provenir de la transcription de trois régions séparées du génome viral en segments d'ARN qui étaient ensuite épissés au corps de l'ARNm pendant le processus de maturation d'un long transcrit primaire.





Micrographie électronique et décalque de l'ARNm de l'hexon hybridé à l'ADN de l'adénovirus. Les boucles monocaténaires A, B et C correspondent aux introns.

Découverte des introns (suite)

Portée de la découverte

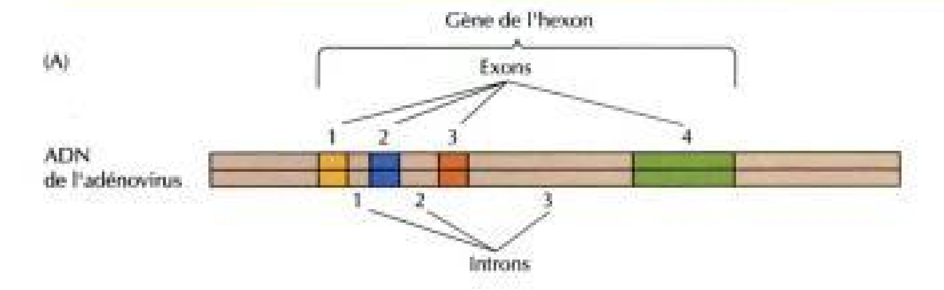
La découverte de l'épissage dans les ARNm de l'adénovirus fut rapidement suivie par une série d'expériences sur des ARNm cellulaires, qui montrèrent que la structure des gènes d'eucaryotes était tout à fait inattendue. Au lieu d'être tout d'un bloc, leur séquence codante était interrompue par des séquences interposées, les introns, éliminés ensuite des transcrits primaires par excision. On sait à présent que les introns représentent une part importante de l'ADN des génomes d'eucaryotes ; on s'applique à trouver leur rôle dans l'évolution et dans la régulation de l'expression des gènes. La découverte du processus d'excision-épissage attisa l'intérêt porté au mécanisme de cette réaction de maturation inattendue. Comme on le verra au chapitre 6, ces travaux ont non seulement mis à jour de nouveaux mécanismes de régulation de l'expression génétique, mais aussi révélé le pouvoir catalytique insoupçonné des ARN et apporté des arguments clé en faveur de l'hypothèse selon laquelle l'évolution moléculaire a joué d'abord sur des molécules d'ARN autoréplicatives. Voilà pourquoi la structure originale de l'ARNm d'un adénovirus a exercé une influence aussi considérable dans plusieurs domaines de la biologie moléculaire et cellulaire.



Richard Roberts



Phillip Sharp



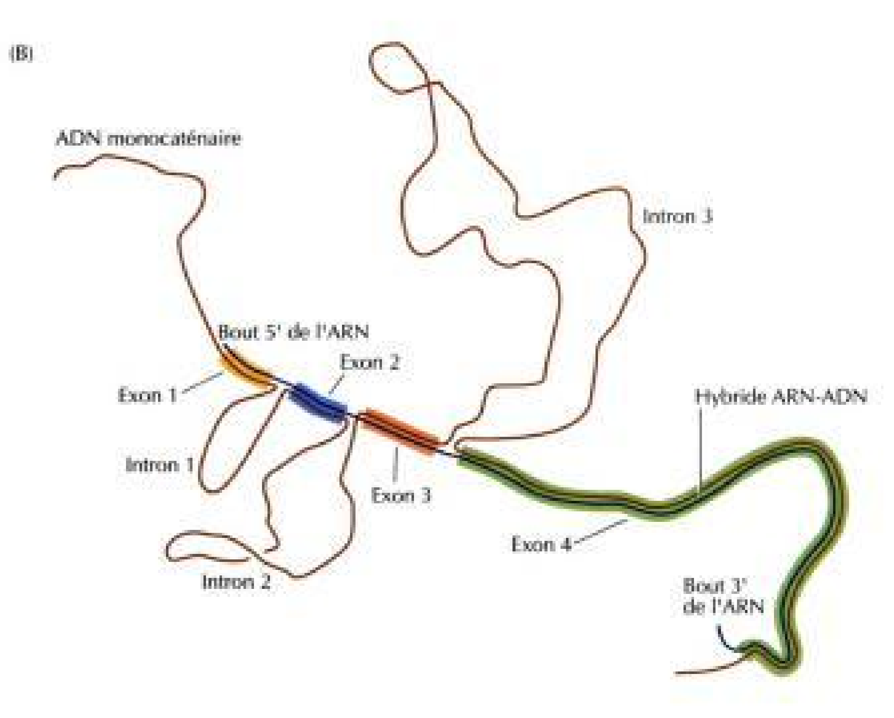


Figure 4.3
Identification des introns de l'ADN viral. (A) Le gène codant l'hexon de l'adénovirus (une protéine importante de la capside virale) comporte 4 exons, séparés par 3 introns. (B) Ce calque reproduit la microphotographie d'un hybride hypothétique entre l'ARNm de l'hexon et la portion correspondante de l'ADN viral. Les exons sont inclus dans les zones d'hybridation ARN-ADN, séparées par des boucles d'ADN monocaténaire correspondant aux introns.

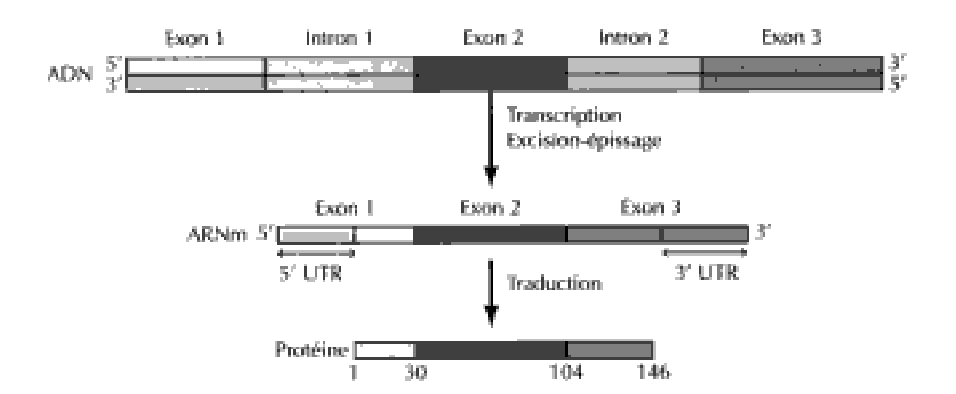


Figure 4.4
Gène de globine β de souris.
Ce gène comprend deux introns, qui partagent la région codante en trois exons. L'exon 1 code les 30 premiers acides aminés, l'exon 2, les acides aminés allant de 31 à 104 et l'exon 3, les acides aminés allant de 105 à 146. Les exons 1 et 3 comportent en plus les régions non traduites (UTR) des extrémités 5′ et 3′ respectives de l'ARNm.

en comparant la séquence des ADN génomiques à celle des ADNc correspondants, on découvrit que la séquence codante du gène de globine β (elle code la chaîne β de l'hémoglobine) est interrompue par deux introns que l'excision-épissage expulse du transcrit d'ARN (figure 4.4). La disposition exon-intron de nombreux gènes d'eucaryotes est très compliquée et la longueur des séquences des introns dépasse souvent celle des séquences des exons : le gène d'ovalbumine de poulet, par exemple, comporte 8 exons et 7 introns, répartis sur environ 7 700 pb (7,7 **kilobases**, ou **kb**) d'ADN génomique ; comme l'ensemble des exons ne compte que environ 1,9 kb, 75 % du gène consiste en introns. Un exemple extrême est celui du gène humain qui code le facteur VIII sanguin de la cascade de coagulation : ce gène s'étend sur environ 186 kb d'ADN et est scindé en 26 exons ; comme la taille de l'ARNm ne dépasse pas 9 kb, la taille des introns du gène se monte à plus de 175 kb. Dans les gènes d'eucaryotes supérieurs, les introns occupent en moyenne près de 10 fois plus d'ADN que les exons.

On trouve des introns dans la plupart des gènes d'eucaryotes supérieurs, mais ce n'est pas une règle absolue ; presque tous les gènes d'histones en sont dépourvus, ce qui indique que les introns ne sont pas indispensables au fonctionnement des gènes d'eucaryotes. En outre, on n'a pas trouvé d'introns dans la plupart des gènes d'eucaryotes inférieurs, telle la levure. Réciproquement, on *trouve* des introns dans quelques gènes de procaryotes. La présence ou l'absence d'introns n'est donc pas un critère absolu de distinction entre gènes de procaryotes et d'eucaryotes, bien qu'on rencontre beaucoup plus souvent des introns chez les eucaryotes supérieurs (tant chez les plantes que chez les animaux), où ils constituent une partie importante de l'ADN génomique total.

Quoique certains introns codent pour un ARN ou une protéine fonctionnelle, la plupart d'entre eux semblent dépourvus de fonction. On pense que les introns sont des résidus de séquences qui jouaient un rôle important au début de l'évolution ; ils contribuèrent par exemple à son accélération, en permettant à des régions codantes (exons) de gènes différents de se recombiner — un processus appelé brassage d'exons. Un exon code souvent un domaine protéique de fonction particulière, de sorte qu'une recombinaison entre introns de gènes différents aboutirait à former un nouveau gène, consistant en une combinaison inédite de séquences codant une protéine. Le séquençage des ADN a confirmé cette hypothèse, en montrant que tel gène est un hybride d'exons prélevés à plusieurs autres gènes : c'est la preuve directe qu'une recombinaison de séquences appartenant à des introns peut donner naissance à un nouveau gène.

Si un brassage d'exons explique de façon satisfaisante un des rôles joués par les introns dans l'évolution, l'origine des introns reste un mystère. Un point de vue (introns dès le départ) suggère que les introns existaient au début de l'évolution, avant que procaryotes et eucaryotes ne divergent ;

selon cette hypothèse, les introns ont joué un rôle important dans l'assemblage initial des séquences codant les protéines des premiers ancêtres des cellules contemporaines. La plupart des gènes de procaryotes et d'eucaryotes inférieurs (par exemple, les levures) auraient ensuite perdu leurs introns, pour répondre à la sélection évolutive d'une réplication rapide, qui aboutit au profilage du génome de ces organismes. Néanmoins, comme les eucaryotes supérieurs ne tirent aucun profit de voir leurs cellules se diviser rapidement, ils ont conservés des introns dans leur génome. L'autre hypothèse (arrivée tardive) propose que les introns apparurent plus tard dans l'évolution, à la suite d'une insertion de séquences d'ADN au sein de gènes déjà constitués sous forme de séquences codantes ininterrompues ; le brassage d'exons aurait alors joué un rôle majeur dans l'évolution future des gènes d'eucaryotes supérieurs, mais sans pouvoir rendre compte du fait que des séquences codant les protéines se soient assemblées avant la divergence entre procaryotes et eucaryotes.

Familles de gènes et pseudogènes

Un autre facteur contribuant à la grande taille du génome des eucaryotes est le fait que certains gènes sont présents en de nombreux exemplaires. Alors que la plupart des gènes de procaryotes ne sont présents qu'en un seul exemplaire, beaucoup de gènes d'eucaryotes sont présents en plusieurs exemplaires, pour former une **famille de gènes**. Dans certains cas, il faut de nombreux exemplaires d'un gène pour produire une grande quantité d'ARN ou de protéine, tel que ARN ribosomiaux ou histones ; dans d'autres cas, tel membre d'une famille de gènes est transcrit uniquement dans tel tissu ou à tel moment du développement embryonnaire, comme, par exemple, les protomères α et β de l'hémoglobine codés par une famille de gènes du génome humain, famille dont les divers composants s'expriment dans les tissus embryonnaires, fœtaux ou adultes (figure 4.5). Les membres de maintes familles de gènes (par exemple, ceux de globine) sont concentrés dans une région de l'ADN, les membres d'autres familles sont dispersées sur des chromosomes différents.

On pense que les familles de gènes se sont formées par duplications d'un gène ancestral primitif, chaque membre divergeant ensuite au cours de l'évolution en accumulant des mutations. Cette diversification permet à des protéines apparentées d'évoluer de façon à optimaliser la fonction qu'elles jouent dans un tissu ou à un stade donné du développement ; l'affinité des hémoglobines fœtales envers O_2, par exemple, est plus élevée que celle des hémoglobines adultes, ce qui permet au fœtus de prélever l'oxygène dans la circulation maternelle.

On doit s'attendre néanmoins à ce que les mutations ne soient pas toutes profitables à la fonction d'un gène. Certains exemplaires de gène conservent en effet des mutations qui rendent le gène impuissant à coder un produit fonctionnel ; les familles de gènes de globine α et β, par exemple, pos-

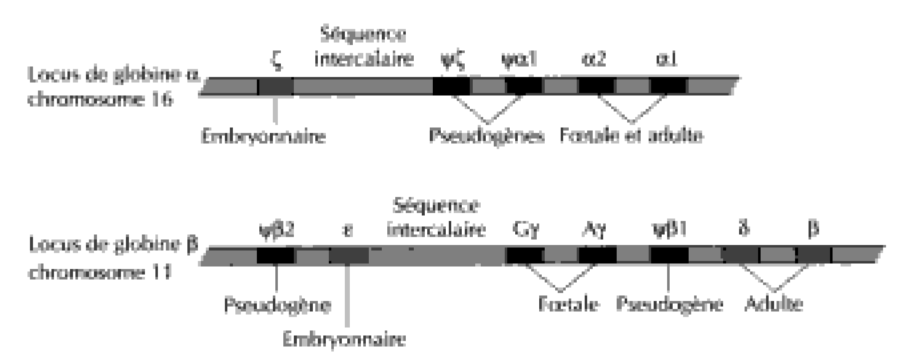


Figure 4.5
Famille des gènes de globine.
Les membres de la famille des gènes humains de globine α et β sont groupés respectivement sur les chromosomes 16 et 11. À côté d'exemplaires de gènes non fonctionnels (pseudogènes), chaque famille comporte des gènes qui s'expriment exclusivement chez l'embryon, chez le fœtus ou chez l'adulte.

sèdent chacune deux gènes qui ont été inactivés par mutations ; ces exemplaires non fonctionnels de gènes (appelés **pseudogènes**) sont des reliques de l'évolution, qui accroissent de façon notoire la taille des génomes eucaryotiques sans y apporter la moindre contribution génétique fonctionnelle.

Séquences d'ADN répétitives

Une part considérable des gènes d'eucaryotes consiste en séquences d'ADN non codantes qui se répètent un grand nombre de fois ; on les trouve parfois à des centaines de milliers d'exemplaires par génome ; Roy Britten et David Kohne les découvrirent en étudiant la vitesse de réassociation de fragments d'ADN cellulaire dénaturés (figure 4.6). Les brins d'ADN dénaturés s'hybrident les uns aux autres (se réassocient pour reformer des brins bicaténaires)(voir figure 3.28) ; comme la réassociation des molécules d'ADN est un processus bimoléculaire (pour pouvoir s'hybrider, deux brins séparés d'ADN dénaturé doivent entrer en collision), la vitesse de réassociation dépend de la concentration des brins d'ADN. Quand on dénature des fragments d'ADN de *E. coli* et qu'on les laisse se réhybrider entre eux, tout l'ADN se réassocie à une même vitesse, comme on doit s'y attendre si chaque séquence d'ADN n'est présente qu'une fois dans le génome. Cependant, la réassociation de fragments d'ADN extrait de cellules de mammifères se comporte autrement : près de 60 % se réassocient à la vitesse attendue pour des brins présents à un seul exemplaire dans le génome, mais le reste se réassocie beaucoup plus rapidement. On interpréta ces résultats en proposant que certaines séquences étaient présentes en un grand nombre d'exemplaires et se réassociaient plus vite que les séquences uniques du génome. Ces expériences montrèrent en particulier qu'environ 40 % de l'ADN de mammifère consiste en séquences répétées un grand nombre de fois, certaines jusqu'à 10^5 et même 10^6 fois.

Des études plus fines ont mis en évidence plusieurs types de ces séquences hautement répétitives. Une classe, celle des **ADN de séquence simple**, contient des séries, en tandem, de milliers d'exemplaires de courtes séquences, allant de 5 à 200 nucléotides. Chez la drosophile, une classe de séquence simple d'ADN consiste, par exemple, en répétition en tandem du bloc nucléotidique ACAAACT. Vu leur composition particulière en bases, beaucoup d'ADN de séquence simple se séparent du reste de l'ADN génomique lors d'une centrifugation à l'équilibre dans un gradient de densité constitué de CsCl ; la densité d'un ADN dépend de sa commposition en bases, les séquences riches en AT étant moins denses que celles riches en GC ; aussi, les séquences simples enrichies en AT se placent-elles en gradient de CsCl à une densité moindre que celles du gros de l'ADN géno-

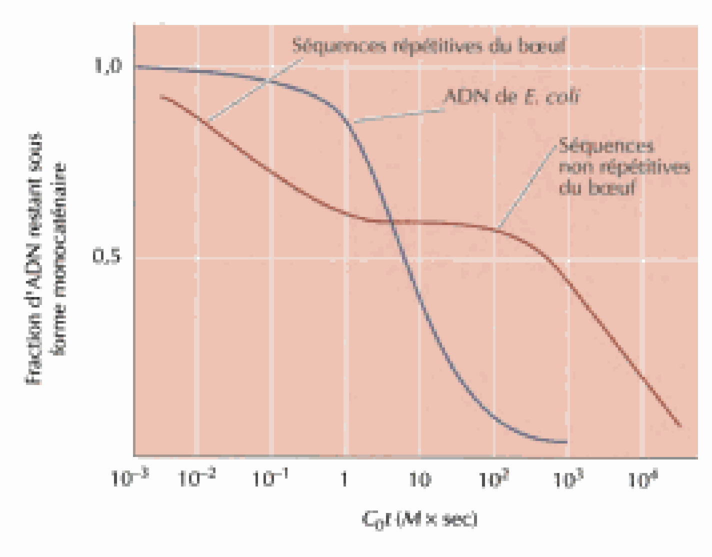


Figure 4.6
Identification des séquences répétitives par réassociation des brins d'ADN. Cinétique de réassociation de fragments d'ADN de *E. coli* et de bœuf en fonction de C_0t, la concentration initiale d'ADN multipliée par le temps d'incubation. L'ADN de *E. coli* se réassocie à vitesse unique, en accord avec le fait que chaque fragment d'ADN n'apparaît qu'une fois dans ce génome de 4,7 x 10^6 paires de bases. Par contre, les fragments d'ADN bovin se réassocient en deux étapes distinctes : 60 % d'entre eux (les séquences non répétitives) se réassocient plus lentement que ne le fait l'ADN de *E. coli*, comme on doit s'y attendre pour des séquences présentes à un seul exemplaire dans le grand génome du bœuf (3 x 10^9 paires de bases), les 40 % restant (séquences répétitives) se réassocient plus rapidement que celle de l'ADN de *E. coli*, montrant que ces séquences sont présentes en de nombreux exemplaires.

mique de *Drosophila* (figure 4.7) ; puisque ces séquences répétitives d'ADN se manifestent comme des bandes « satellites » de la bande principale d'ADN, on les appelle bandes d'**ADN satellite**. On retrouve ces séquences à des millions d'exemplaires par génome, ce qui fait qu'elles occupent 10 à 20 % de l'ADN du génome des eucaryotes supérieurs. Ces séquences simples ne sont pas transcrites et ne servent pas à transmettre une information génétique fonctionnelle ; certaines d'entre elles joueraient cependant un rôle important dans la structure des chromosomes.

D'autres séquences répétitives ne sont pas agglomérées à la file indienne dans le génome, mais y sont dispersées ; on les classe en petits éléments dispersés (**SINE**, *short interspersed elements*) et longs éléments dispersés (**LINE**, *long interspersed elements*). Les principales SINE des génomes de mammifère sont les **séquences *Alu***, ainsi nommées parce qu'elles contiennent d'habitude un seul site de restriction par l'enzyme *Alu*I. La taille des séquences *Alu* est en moyenne de 300 paires de bases ; le million d'entre elles que contient le génome occupe presque 10 % de l'ADN cellulaire total. Bien que ces séquences soient transcrites en ARN, elles ne codent aucune protéine et on ignore quel est leur rôle. La majorité des séquences LINE humaines (qui appartiennent à la famille LINE 1, ou L1) comprend près de 6 000 paires de bases et on en trouve environ 5 000 exemplaires dans le génome ; ces séquences L1 sont transcrites et, si au moins quelques-unes codent des protéines, on ne leur connait, comme c'est le cas des séquences *Alu*, aucun rôle dans la physiologie cellulaire.

Tant les séquences *Alu* que les séquences L1 sont des exemples d'éléments transposables, c'est-à-dire capables de se déplacer au sein de l'ADN génomique (voir chapitre 5). Certaines d'entre elles serviraient à moduler l'expression des gènes, mais en général elles ne semblent pas jouer un rôle utile dans la cellule. En contribuant à diversifier les génomes, elles auraient cependant rempli un rôle évolutif important.

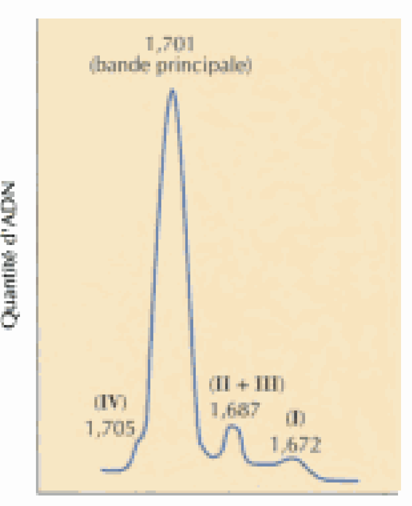


Figure 4.7
ADN satellite. En centrifugeant à l'équilibre de l'ADN de *Drosophila* en gradient de CsCl, on sépare les ADN satellites (désignés I à IV : densité de flottaison égale à 1,672, 1,687 et 1,705 g cm^{-3}) de la bande principale d'ADN génomique (densité de flottaison de 1,701 g cm^{-3}).

Nombre de gènes présents dans la cellule eucaryotique

Après avoir considéré les diverses espèces d'ADN non codant qui interviennent dans la complexité génétique des eucaryotes, il est intéressant d'examiner le nombre total de gènes d'un génome d'eucaryote. En supposant que les polypeptides comportent en moyenne environ 400 résidus d'acide aminé, la taille moyenne de la séquence codante correspondante est de 1 200 paires de bases. Le génome de *E. coli* s'étend sur 4,7 x 10^6 paires de bases et les données actuelles suggèrent que *E. coli* pourrait posséder près de 4 000 gènes, ce qui concorde avec le fait que la majeure partie de son ADN comprend des séquences codant des protéines.

Comme ceux de *E. coli*, la plupart des gènes de levure sont dépourvus d'introns. Si la plus grande part des séquences du génome de levure (long de 1,4 x 10^7 pb) servait à coder des protéines, on devrait s'attendre à découvrir de 5 000 à 10 000 gènes chez la levure ; ce chiffre correspond grossièrement au nombre de gènes identifiés par séquençage de l'ADN génomique de la levure, comme on va le voir plus loin.

À l'opposé de *E. coli* et des levures, les eucaryotes supérieurs (y compris l'Homme) possèdent un génome bourré d'ADN non codant ; on considère que seule une petite partie des 3 x 10^9 paires de bases du génome humain correspond à des séquences codant des protéines. Comme un tiers environ de ce génome est occupé par des séquences hautement répétitives, il doit rester 2 x 10^9 paires de bases pour les gènes fonctionnels, les pseudogènes et les séquences intercalaires non répétitives. Si le gène représentatif s'étend sur 10 000 à 20 000 paires de bases (introns compris), on estime que le génome humain comporte 100 000 gènes, les séquences codant les protéines n'occupant ainsi qu'environ 3 % de l'ADN humain. Si le résultat de ce calcul est plausible, on doit cependant le vérifier et le corriger par les données que va bientôt fournir le séquençage du génome humain.

CHROMOSOMES ET CHROMATINE

Les génomes eucaryotiques ne se distinguent pas seulement des procaryotiques par leur plus grande complexité, mais aussi par le fait que leur ADN est conformé différemment de celui des cellules procaryotiques. Les génomes de procaryote tiennent dans un chromosome unique, qui est d'habitude une molécule d'ADN refermée sur elle-même, alors que les génomes d'eucaryote se partagent plusieurs chromosomes, composés chacun d'une molécule d'ADN ouverte. Bien que les chromosomes varient fort d'une espèce à l'autre par leur nombre et leur taille (tableau 4.1), leur structure de base est identique chez tous les eucaryotes. L'ADN de la cellule eucaryotique est noyé dans une gangue de petites protéines basiques (les histones) qui lui confèrent une organisation compacte au sein du noyau cellulaire ; c'est là un rôle capital, vu la quantité d'ADN que renferme une cellule d'eucaryote : la longueur totale de l'ADN humain étiré atteint 2 m, mais cet ADN doit tenir dans un noyau de 5 à 10 µm de diamètre. Quoique le compactage de l'ADN pose aussi un problème à la bactérie, le mécanisme qui compacte l'ADN procaryotique est différent de celui décrit chez les eucaryotes et est encore mal connu.

Chromatine

L'association formée entre l'ADN eucaryote et les protéines est la **chromatine**, qui contient près de deux fois autant de protéine que d'ADN. Les principales protéines de la chromatine sont les **histones**, petites protéines très riches en acides aminés basiques (arginine et lysine) qui favorisent la liaison aux charges négatives de la molécule d'ADN. Il existe cinq types principaux d'histones, notées H1, H2A, H2B, H3 et H4, qui varient à peine d'une espèce d'eucaryote à l'autre (tableau 4.2). Les histones se trouvent en quantité importante dans la cellule eucaryote, puisque leur masse équivaut à peu près à celle de l'ADN cellulaire. En outre, la chromatine contient une masse à peu près équivalente d'une grande variété de protéines chromosomiques non histones. On connaît plus d'un millier de types de ces pro-

Tableau 4.1 Nombre de chromosomes chez quelques eucaryotes

Organisme	Taille du génome (Mb)[a]	Nombre de chromosomes[a]
Levure (*Saccharomyces cerevisiae*)	14	16
Moisissure visqueuse (*Dictyostelium*)	70	7
Arabidopsis thaliana	70	5
Maïs	5 000	10
Oignon	15 000	8
Lis	50 000	12
Nématode (*Caenorhabditis elegans*)	100	6
Drosophile	165	4
Xénope	3 000	18
Dipneuste	50 000	17
Poulet	1 200	39
Souris	3 000	20
Bœuf	3 000	30
Chien	3 000	39
Homme	3 000	23

[a]Tant la taille du génome que le nombre de chromosomes valent pour la cellule haploïde.

Mb = million de paires de bases.

Tableau 4.2 Principales protéines de type histone

Histone[a]	Masse moléculaire	Nombre de résidus d'acide aminé	Pourcentage de Lys + Arg
H1	22 500	244	30,8
H2A	13 960	129	20,2
H2B	13 774	125	22,4
H3	15 273	135	22,9
H4	11 236	102	24,5

[a] Données chez le lapin (H1) et le bœuf.

téines ; leurs rôles sont multiples, notamment dans la réplication d'ADN et dans l'expression des gènes. L'ADN de procaryote est lui aussi associé à des protéines, dont une partie tiendrait le rôle d'histones, à savoir compacter l'ADN au sein de la cellule. Pourtant, les histones sont particulières à la cellule eucaryote et rendent compte de l'organisation structurale propre à cette cellule.

Le module de base de la chromatine est le **nucléosome**, décrit par Roger Kornberg en 1974 (figure 4.8). Le modèle proposé par Kornberg s'appuie sur deux sortes d'expériences. L'une, la digestion partielle de la chromatine par une nucléase (elle hydrolyse l'ADN) de *Micrococcus* donnait des fragments d'ADN longs d'environ 200 paires de bases, tandis qu'une digestion semblable de l'ADN nu (privé de ses protéines) donnait un dégradé continu de fragments de taille tout venant. Ceci suggérait que la fixation de protéines à l'ADN empêchait certaines zones de la molécule d'ADN d'être attaquées par la nucléase, de sorte que seules certains sites distants d'environ 200 pb étaient sensibles à la nucléase. En accord avec cette idée, le

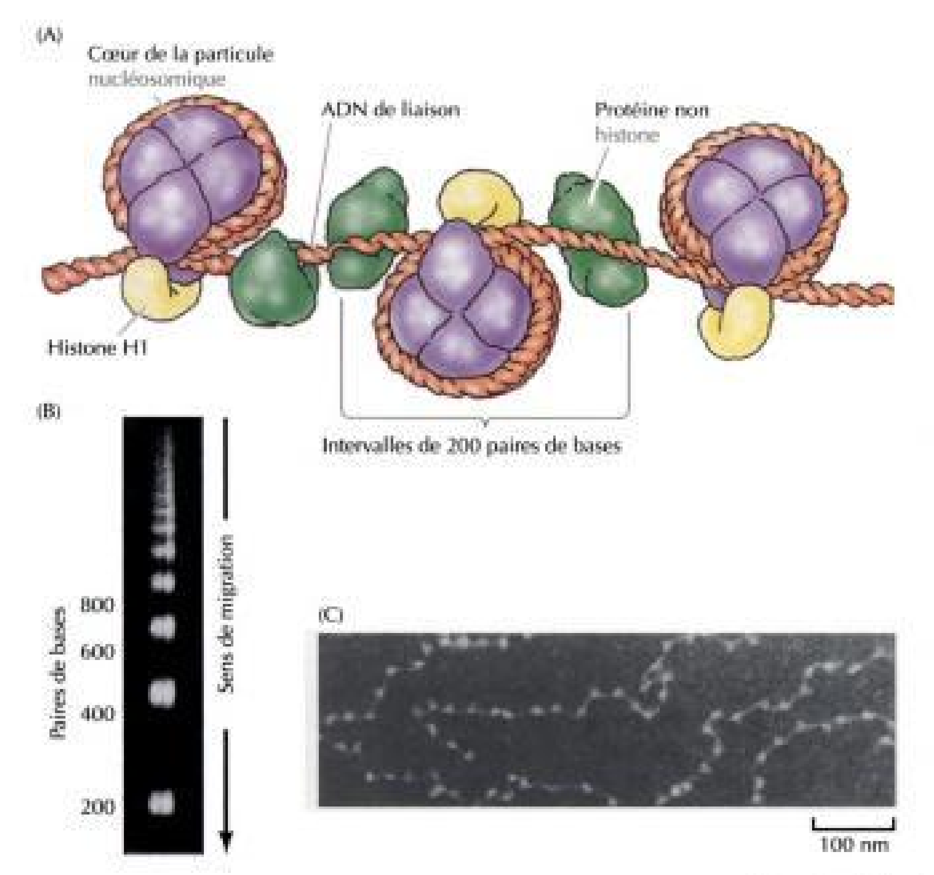


Figure 4.8
Substructure nucléosomique de la chromatine. (A) L'ADN forme une boucle autour des histones du cœur du nucléosome, boucle qui est maintenue par l'histone H1. Les protéines non histones se lient à l'ADN unissant un cœur de nucléosome au voisin. (B) Électrophorèse en gel de fragments d'ADN obtenus en digérant la chromatine par la nucléase de *Micrococcus* ; l'ADN unissant les cœurs nucléosomiques est très sensible à l'enzyme, de sorte qu'une digestion limitée de la chromatine donne des fragments correspondant à des multiples de 200 paires de bases. (C) Micrographie électronique d'une fibre de chromatine étirée pour montrer sa structure en collier de perles. (B, due à l'obligeance de Ada L. Olins et Donald E. Olins, Oak Ridge National Laboratory).

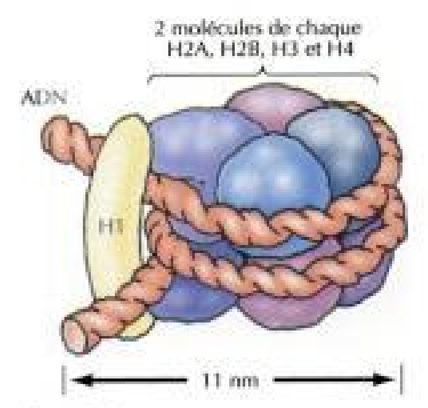


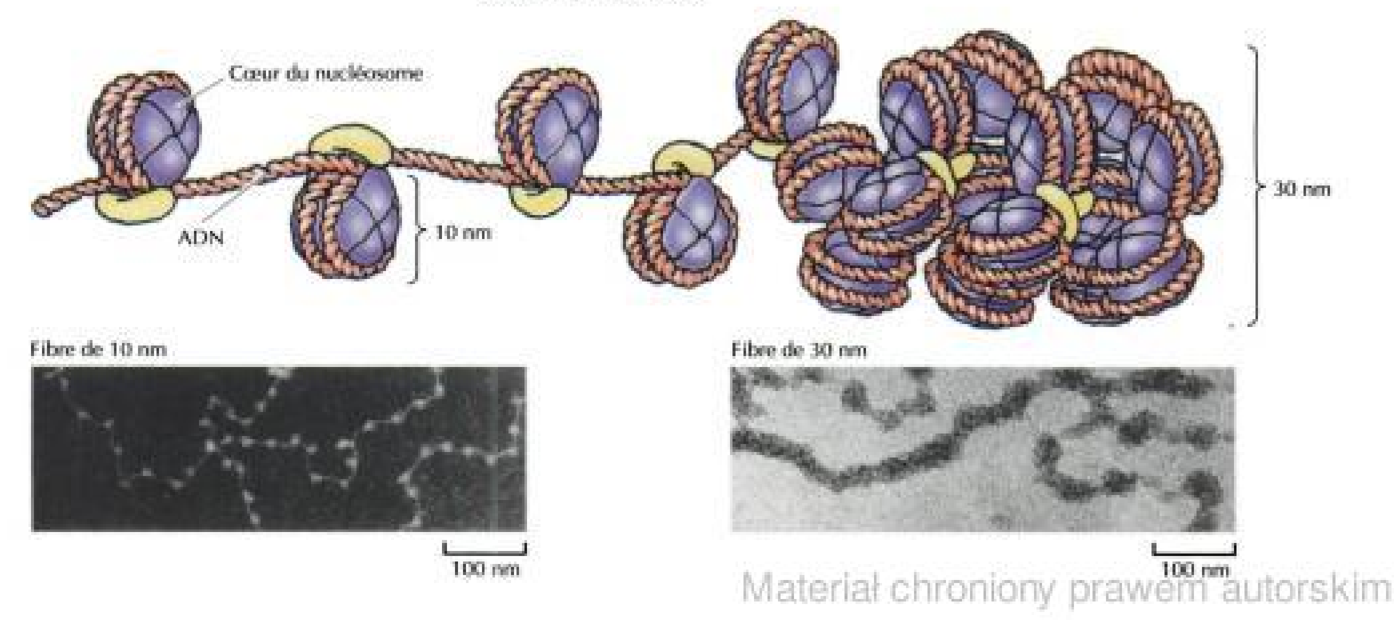
Figure 4.9
Structure du chromatosome. Le cœur du nucléosome comporte 146 paires de bases d'ADN faisant une boucle de 1,75 tour autour d'un octamère d'histones composé de deux protomères de chacune des histones H2A, H2B, H3 et H4. Le chromatosome comporte deux tours complets de brin d'ADN (166 paires de bases) maintenus en place par une molécule d'histone H1.

microscope électronique révéla que les fibres de chromatine ressemblent à un collier dont les perles sont distantes d'à peu près 200 paires de bases. Tant la digestion par la nucléase que l'observation au microscope électronique montraient donc que la chromatine est constituée d'une enfilade de modules d'environ 200 pb, qu'on baptisa nucléosomes.

En prolongeant la digestion de la chromatine par la nucléase de *Micrococcus*, on obtint des particules (appelées **cœurs des particules nucléosomiques**), qui correspondaient aux perles visibles au microscope électronique. En les étudiant de plus près, on constata qu'elles comportent une molécule d'ADN de 146 paires de bases, qui fait 1,75 tour autour d'un cœur d'histones constitué de deux protomères de chacune des histones H2A, H2B, H3 et H4 (les histones centrales)(figure 4.9). Une molécule de la cinquième histone, H1, se fixe à l'ADN là où celui-ci prend contact avec chacune des particules nucléosomiques. L'ensemble constitue l'entité chromatinienne appelée **chromatosome**, constitué de 166 paires de bases d'ADN enroulées autour d'un cœur d'histones, en une boucle scellée par l'histone H1 (une histone de liaison). Bien qu'on retrouve ces cœurs d'histones chez tous les eucaryotes, la levure *Saccharomyces cerevisiae* est dépourvue d'histone H1, ce qui indique que les histones de liaison ne sont pas indispensables à la formation du nucléosome.

L'enroulement de l'ADN autour des histones produit une fibre chromatinienne d'environ 10 nm de diamètre, consistant en chromatosomes séparés par des tronçons d'ADN longs d'environ 80 paires de bases (figure 4.10) ; au microscope électronique, cette fibre présente l'aspect du collier de perles, qui suggéra le modèle adopté pour le nucléosome. Ce compactage de l'ADN en fibre chromatinienne de 10 nm raccourcit ses dimensions d'environ six fois. La chromatine se condense ensuite en se pelotonnant en fibres de 30 nm, une structure dont il faudra résoudre le détail ; il semble que l'interaction entre les molécules d'histone H1 joue un rôle important à cette étape de la condensation de la chromatine, témoin le fait que la chromatine de *S. cerevisiae* (dépourvue d'histone H1) reste dans une conformation moins compacte.

Figure 4.10
Fibres de chromatine. Le compactage de l'ADN en nucléosomes forme une fibre chromatinienne d'environ 10 nm de diamètre. La chromatine continue à se condenser en fibres de 30 nm, contenant près de six nucléosomes par tour. (Clichés aimablement fournis par Ada L. Olins et Donald E. Olins, Oak Ridge National Laboratory).



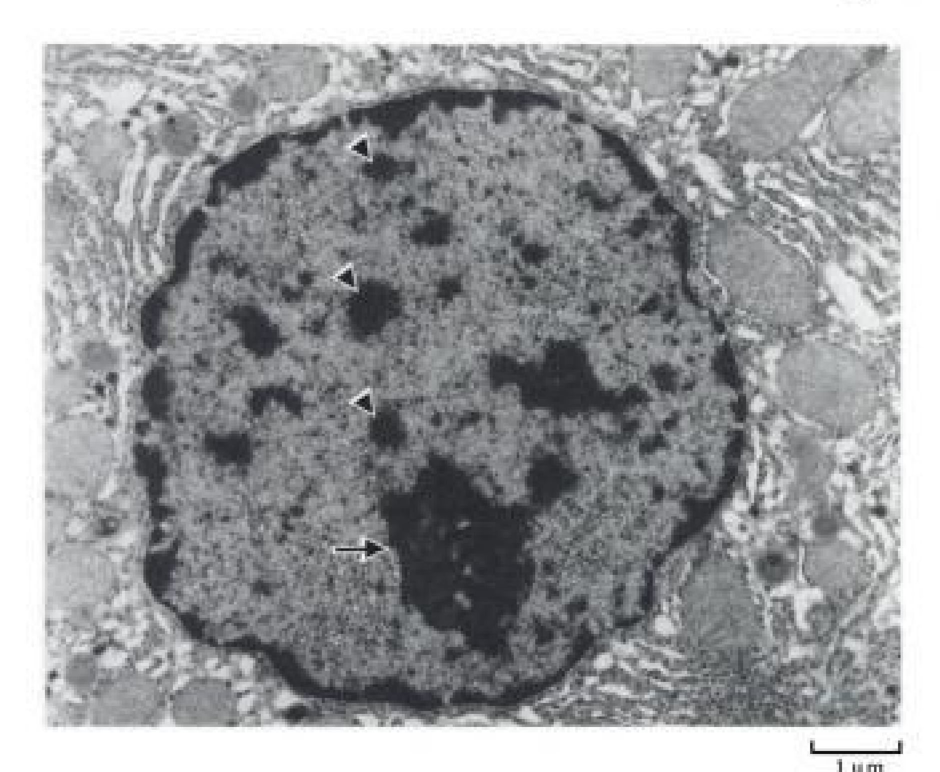


Figure 4.11
Chromatine pendant l'interphase. Micrographie électronique d'un noyau durant l'interphase. L'euchromatine est répartie dans tout le noyau. Les pointes de flèches indiquent les zones d'hétérochromatine, la flèche le nucléole. (Clichés dus à l'amabilité de Ada L. Olins et Donald E. Olins, Oak Ridge National Laboratory).

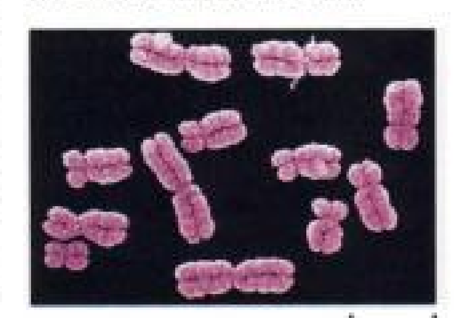
Le degré de condensation de la chromatine varie au cours du cycle cellulaire. Pendant l'interphase des cellules (non mitotiques), la plus grande part de la chromatine (appelée **euchromatine**) est assez bien décondensée et dispersée dans tout le volume du noyau (figure 4.11) ; durant cette phase du cycle cellulaire, les gènes sont transcrits et l'ADN se réplique pour la prochaine mitose. À l'interphase, l'euchromatine apparaît en grande partie sous forme de fibres de 30 nm, agencées en grandes boucles d'environ 50 à 100 kb d'ADN ; près de 10 % de l'euchromatine, celle qui contient les gènes activement transcrits, est dans l'état plus décondensé (la conformation en fibres de 10 nm) qui permet la transcription. Comme nous le verrons au chapitre 6, la structure de la chromatine est donc intimement liée à la commande de l'expression des gènes chez les eucaryotes.

Contrairement à l'euchromatine, environ 10 % de la chromatine interphasique (appelée **hétérochromatine**) conserve un état très condensé qui ressemble à la chromatine au moment de la mitose ; l'hétérochromatine échappe à la transcription et contient des séquences d'ADN hautement répétitives, comme celles qu'on trouve au niveau des centromères et des télomères.

Quand la cellule entre en mitose, ses chromosomes se condensent au maximum, de sorte qu'ils peuvent être répartis entre les cellules filles. On pense que les boucles de fibres chromatiniennes de 30 nm continuent à se replier sur elles-mêmes pour former les chromosomes métaphasiques compacts observés dans les cellules en mitose, où l'ADN s'est compacté près de 1 000 fois (figure 4.12). Sous cette forme condensée, la chromatine ne peut plus servir de matrice pour la synthèse d'ARN, au point que la transcription est à l'arrêt pendant la mitose. Les micrographies électroniques montrent que l'ADN des chromosomes métaphasiques est organisé en grandes boucles arrimées à un échafaudage protéique (figure 4.13), mais on ne connaît encore ni la structure fine de cette chromatine fortement condensée ni le mécanisme de cette condensation.

Les chromosomes métaphasiques sont tellement condensés qu'on arrive à étudier leur morphologie au microscope optique (figure 4.14) ; grâce à

Figure 4.12
Condensation de la chromatine durant la mitose. Chromosomes métaphasiques vus au microscope électronique à balayage, après coloration artificielle (Biophoto Associates/Photo Research Inc).



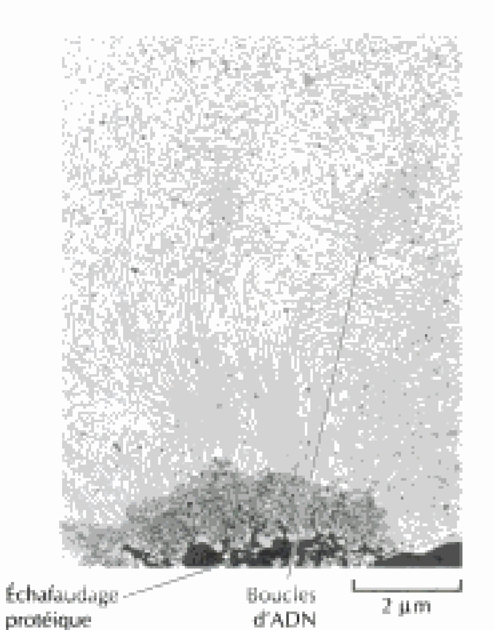


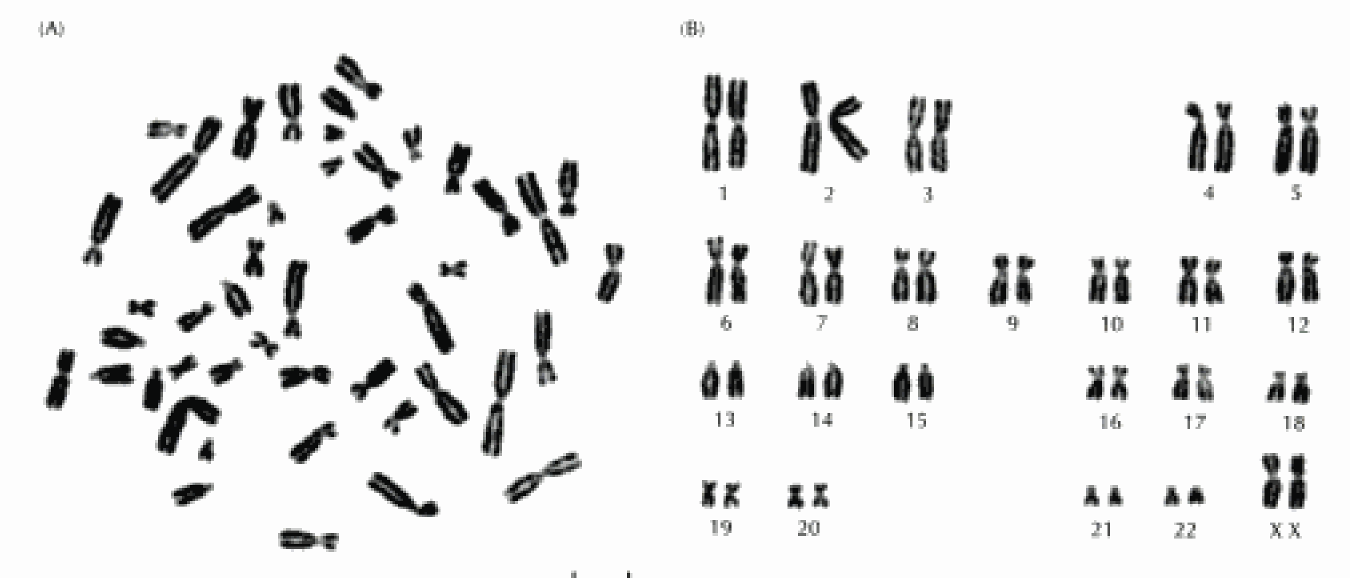
Figure 4.13
Structure de chromosomes métaphasiques. Micrographie électronique de boucles d'ADN arrimées à un échafaudage de chromosome métaphasique dont on a éliminé les histones. (D'après Paulson et Laemmli, 1977, *Cell* **12**:817).

diverses méthodes de coloration, on observe des profils caractéristiques de striation en bandes chromosomiques alternativement claires et sombres, dus à une fixation préférentielle de colorants ou de substances fluorescentes sur les séquences riches en AT par rapport à celles riches en GC. Le profil de ces bandes est propre à chaque chromosome et typique de certaines zones d'un chromosome. L'hybridation *in situ* arrive à localiser certains gènes à une bande particulière d'un chromosome, ce qui montre que le compactage de l'ADN est un processus bien ordonné et reproductible.

Centromères

Le **centromère** est une zone spécialisée du chromosome qui remplit un rôle clé, à savoir la répartition correcte des chromosomes dupliqués entre les cellules filles au moment de la mitose (figure 4.15). L'ADN cellulaire se réplique durant l'interphase, pour donner deux exemplaires de chacun des chromosomes avant que la mitose ne démarre. Quand la cellule entre en mitose, la chromatine se condense pour former les chromosomes métaphasiques, faits de deux chromatides sœurs ; celles-ci sont soudées au niveau du centromère, qui apparaît sous forme d'une zone rétrécie du chromosome. Quand la mitose progresse, les microtubules du fuseau mitotique se fixent au centromère et les deux chromatides sœurs s'écartent pour rejoindre chacune un des pôles du fuseau. Quand la mitose s'achève, les enveloppes nucléaires se reforment et les chromosomes se décondensent : on voit apparaître deux noyaux fils contenant chacun un exemplaire de chaque chromosome parental.

Figure 4.14
Chromosomes humains à la métaphase. (A) Micrographie optique de chromosomes humains étalés à partir d'une cellule en métaphase. (B) On les a arrangés par paires en les numérotant du plus grand (chromosome 1) au plus petit. Comme les chromosomes proviennent d'une femme, on voit 22 paires d'autosomes et deux chromosomes X. (Craig Holmes / Biological PhotoService).



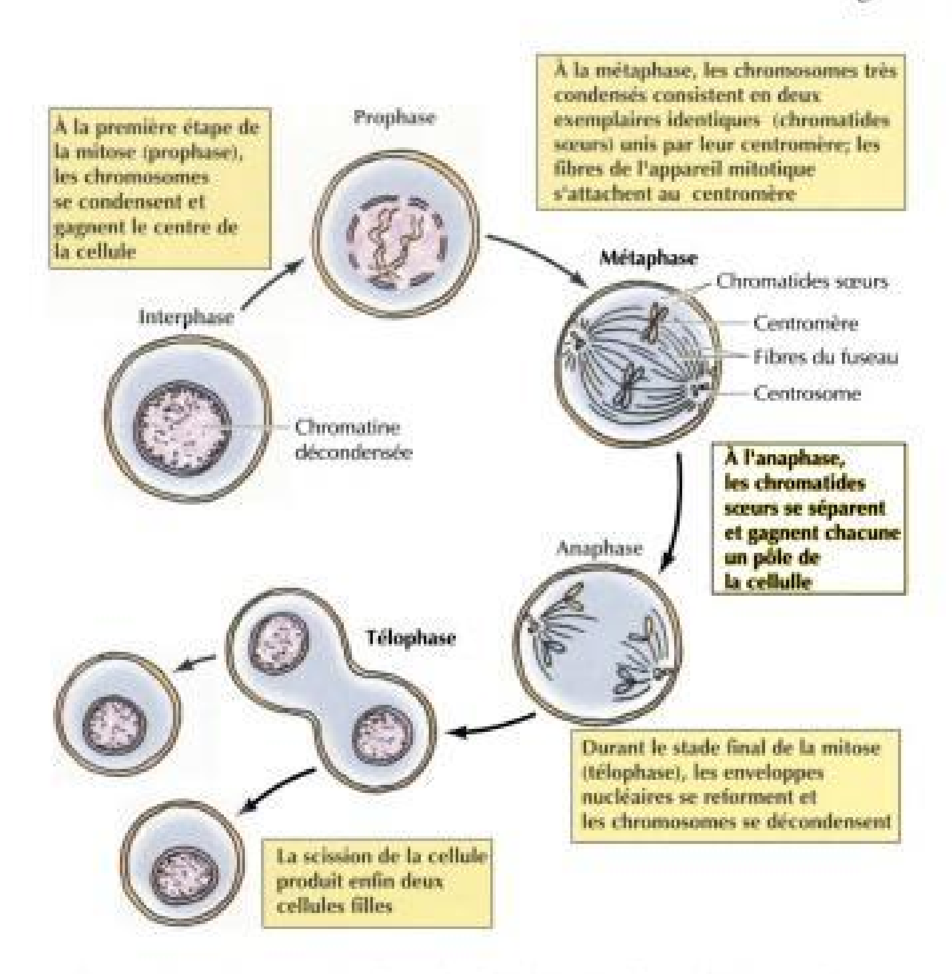


Figure 4.15
Sort des chromosomes pendant la mitose. Comme l'ADN se réplique durant l'interphase, la cellule entrant en mitose possède deux exemplaires identiques de chaque chromosome.

Les centromères servent donc à la fois de point de soudure aux chromatides sœurs et de point d'ancrage aux microtubules du fuseau mitotique. Ils consistent en séquences d'ADN particulières auxquelles s'attachent plusieurs protéines propres au centromère, pour former une structure spéciale appelée **kinétochore** (figure 4.16). L'ancrage des microtubules aux protéines du kinétochore assure l'arrimage des chromosomes au fuseau mitotique. Les protéines associées au kinétochore servent alors de « moteur moléculaire » pour entraîner les chromosomes le long des fibres du fuseau et répartir les chromosomes aux noyaux fils.

Les séquences centromériques le mieux connues sont celles de la levure ; on arrive facilement à élucider leur rôle en examinant la ségrégation des plasmides au moment de la mitose (figure 4.17). Les plasmides équipés de centromères fonctionnels se séparent comme des chromosomes et sont répartis de façon égale entre cellules filles à la mitose, mais en l'absence de centromère fonctionnel, un plasmide répliqué n'est pas réparti équitablement et beaucoup de cellules n'hériteront pas de cet ADN plasmidien. Les expériences de ce type ont permis d'identifier les séquences responsables de la fonction jouée par le centromère : elles ont d'abord révélé que les séquences centromériques de la levure bien connue *S. cerevisiae* tiennent dans environ 125 paires de bases, distribuées en trois éléments de

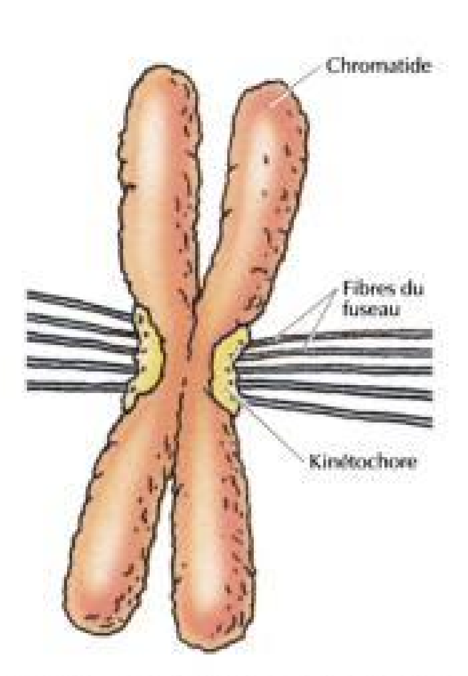


Figure 4.16
Centromère d'un chromosome métaphasique. Le centromère est la région au niveau de laquelle les deux chromatides sœurs restent unies lors de la métaphase. Des protéines particulières se fixent à l'ADN centromérique pour former le kinétochore, auquel s'arriment les fibres du fuseau.

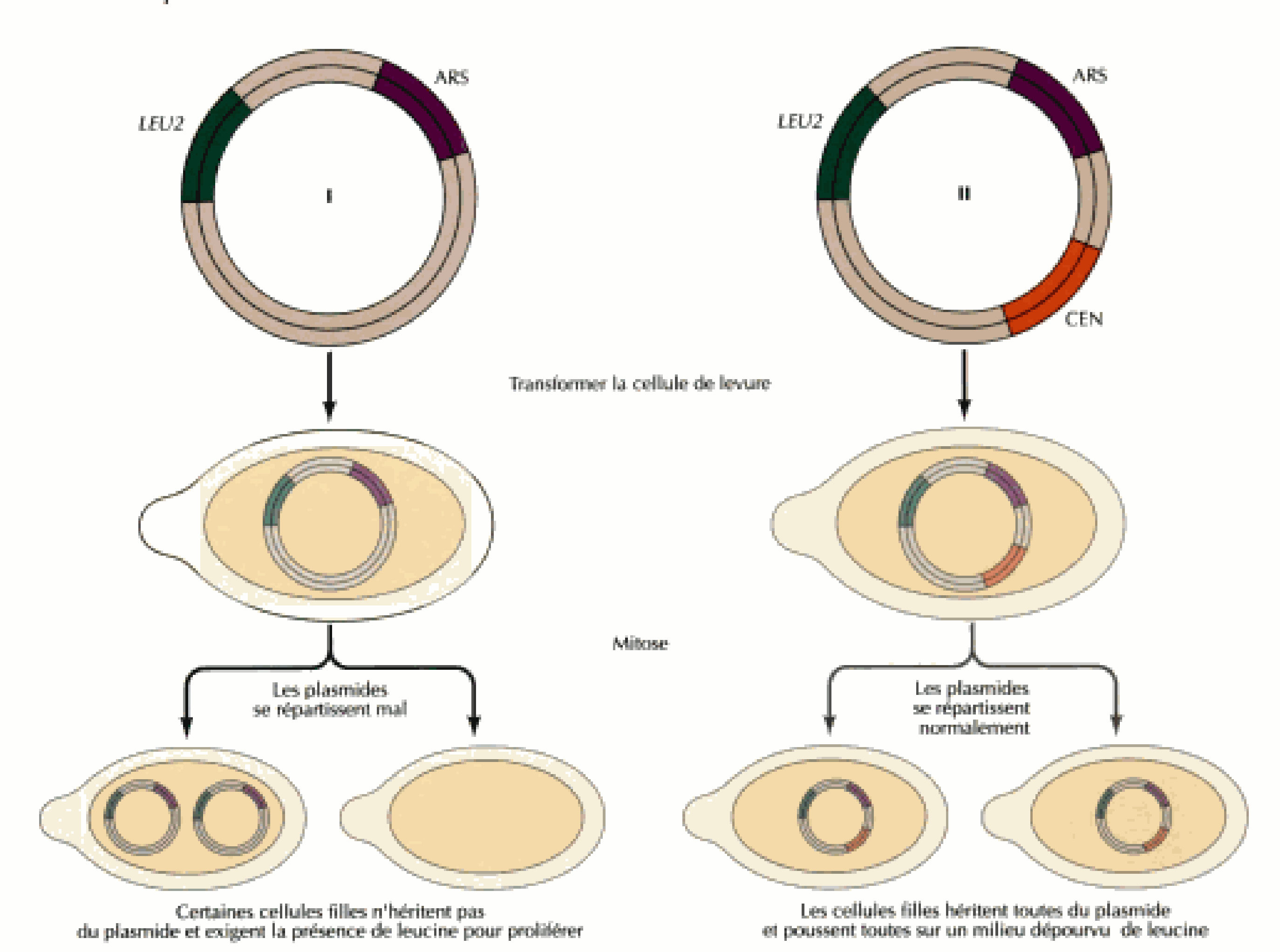


Figure 4.17
Démonstration du rôle du centromère chez la levure. Les deux plasmides du dessin portent un marqueur de sélection (*LEU2*) et des séquences d'ADN qui servent d'origine de réplication chez la levure (ARS, c'est-à-dire séquences à répétition autonome). Le plasmide I est cependant dépourvu de centromère et n'est pas légué à chacune des cellules, par défaut de ségrégation durant la mitose. Par contre, la présence d'un centromère (CEN) dans le plasmide II garantit sa transmission régulière à chacune des cellules filles.

séquences, à savoir deux courtes séquences de 8 et 25 pb séparées par une suite de 78 à 86 pb d'ADN très enrichie en AT (figure 4.18).

Les courtes séquences centromériques trouvées chez *S. cerevisiae* sont cependant absentes chez d'autres eucaryotes. De récents travaux ont identifié, par une approche analogue, les centromères de la levure non bourgeonnante *Schizosaccharomyces pombe*. Bien qu'on ait affaire à deux levures, elles divergent autant entre elles qu'elles ne divergent l'une et l'autre de l'Homme et se distinguent l'une de l'autre par maints aspects de leur biologie cellulaire : aussi ces deux espèces de cellules servent-elles de modèles complémentaires de cellule eucaryote simple et d'approche expérimentale facile. Les centromères de *S. pombe* occupent de 50 à 100 kb d'ADN, soit près de mille fois la taille de ceux de *S. cerevisiae*. Ils consistent en un noyau central unique de 7 000 paires de bases d'ADN en un seul exemplaire, flanqué par des répétitions en tandem de trois séries de séquences répétitives (figure 4.19). Ce centromère ne fonctionne que s'il possède non seulement ce noyau central, mais aussi les séquences répétitives qui le bordent ; le centromère de *S. pombe* est donc notablement plus complexe que celui de *S. cerevisiae*.

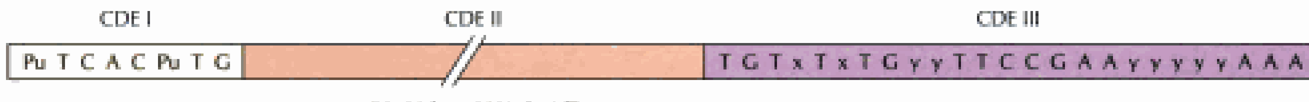


Figure 4.18
Séquences centromériques de *S. cerevisiae.* Les séquences centromériques (CEN) consistent en deux courtes séquences bien conservées (CDEI et CDEIII) séparées par un ADN de 78 à 86 paires de bases (pb), enrichi en AT (CDEII). Les séquences illustrées sont des séquences consensus émanant de l'examen des séquences centromériques de chacun des chromosomes de levure. Pu = A ou G ; X = A ou T ; y = n'importe quelle base.

Les centromères des eucaryotes supérieurs n'ont pas été caractérisés par des études fonctionnelles, mais ceux des mammifères se singularisent par de grands segments d'hétérochromatine constitués de séquences d'ADN satellites fréquemment répétées. Chez l'Homme et les autres primates, la principale séquence centromérique est l'ADN satellite α, une séquence de 171 pb répétée à la queue leu leu sur plusieurs millions de paires de bases. Cet ADN satellite α interviendrait dans la structure et le fonctionnement du centromère car on a montré qu'il fixe les protéines associées au centromère, mais le rôle de cet ADN satellite reste à préciser, comme c'est le cas des capacités présumées des autres séquences répétitives des centromères de mammifère. En accord avec leur grande taille, les centromères de mammifère forment de gros kinétochores, qui arriment de 30 à 40 microtubules, alors qu'un seul microtubule s'attache au centromère des chromosomes de *S. cerevisiae*.

Télomères

Les séquences présentes aux bouts des chromosomes d'eucaryotes, les **télomères**, jouent un rôle critique dans la réplication et la stabilité des chromosomes. On les découvrit comme des structures inhabituelles parce que les chromosomes de la cellule eucaryote étaient tout à fait instables une fois rompus, ce qui suggérait que des séquences particulières occupaient normalement les bouts des chromosomes. On le confirma plus tard en greffant des télomères du protozoaire *Tetrahymena* aux extrémités de molécules d'ADN ouvertes d'un plasmide de levure ; ainsi agrémentés de séquences d'ADN télomériques, ces plasmides se répliquaient comme des molécules rappelant les chromosomes ouverts de levure, ce qui montrait directement que les télomères sont indispensables à la réplication des molécules d'ADN ouvertes.

Chez une grande variété d'eucaryotes, les séquences d'ADN télomériques se ressemblent : ce sont des répétitions d'une séquence simple d'ADN comportant des groupes de résidus G sur un des brins (tableau 4.3). Ainsi, la séquence modulaire répétée des télomères de l'Homme et d'autres mammifères est AGGGTT, celle de *Tetrahymena* est GGGGTT ; ces séquences se répètent des centaines, voire des milliers de fois, en occupant plusieurs kilobases.

Les télomères ont un rôle capital dans la réplication des extrémités des molécules d'ADN ouvertes (voir chapitre 5). L'ADN polymérase est capable d'allonger une chaîne naissante d'ADN, mais est incapable d'amorcer la synthèse d'une nouvelle chaîne à l'extrémité d'une molécule ouverte d'ADN ; aussi, les extrémités des chromosomes ouverts ne sont-elles pas répliquées par l'action habituelle de l'ADN polymérase. Au cours de l'évolution, ce problème a été résolu par l'apparition d'un mécanisme singulier, mettant en jeu une activité de transcriptase inverse pour répliquer les séquences d'ADN du télomère (synthétase de télomère).

Figure 4.19
Centromères de *S. pombe.* On a indiqué l'arrangement des séquences centromériques du chromosome II. Elles comportent un cœur central (CC) de séquence d'ADN singulière, flanqué par des répétitions à la queue leu leu d'un bloc de trois éléments modulaires (B, K et L).

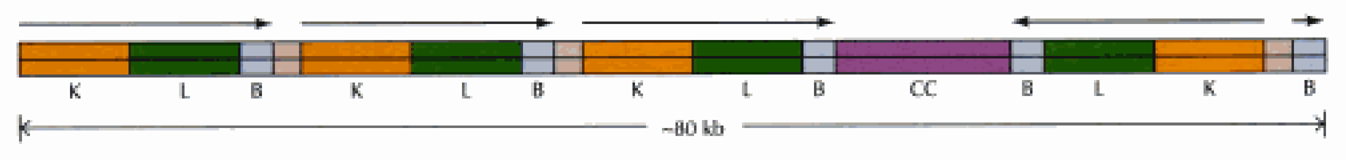


Tableau 4.3 ADN des télomères

Organisme	Séquences télomériques répétitives
Levures	
Saccharomyces cerevisiae	$G_{1-3}T$
Saccharomyces pombe	$G_{2-5}TTAC$
Protozoaires	
Tetrahymena	GGGGTT
Dictyostelium	$G_{1-8}A$
Plantes	
(*Arabidopsis*)	AGGGTTT
Mammifères	
(Homme)	AGGGTT

DRESSER LA CARTE DE TOUT UN GÉNOME ET LE SÉQUENCER

L'une des tentatives les plus passionnantes de la biologie moléculaire consiste maintenant à trouver la séquence nucléotidique complète du génome humain et des génomes de divers organismes modèles, dont *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila*, *Arabidopsis* ainsi que la souris. La possibilité de recombiner des séquence d'ADN a eu un impact énorme sur notre compréhension des bases de la biologie cellulaire, car elle a permis d'isoler et de séquencer toute une série de gènes importants. Il n'y a pas si longtemps que les chercheurs se bornaient à cloner, séquencer et caractériser tel ou tel gène, mais, à présent, la technologie de l'ADN recombinant leur permet de cloner et séquencer des génomes entiers. En principe, cette approche pourrait identifier tous les gènes d'un organisme, gènes dont il est alors possible d'étudier la structure et la fonction. Le séquençage d'un génome devrait donc fournir aux chercheurs une base de données unique, à savoir la séquence nucléotidique de séries complètes de gènes ; comme beaucoup d'entre eux n'auront pas encore été identifiés, la détermination de leur fonction va faire l'objet de nombreuses études de biologie cellulaire.

Génome de procaryotes

La première séquence complète d'un génome cellulaire, publiée en 1995 par le groupe de J. Craig Venter, est celle de la bactérie *Haemophilus influenzae*, un commensal habituel des voies respiratoires de l'Homme. Le génome de *H. influenzae* comprend à peu près 1,8 x 10^6 paires de bases (1,8 **mégabase,** ou **Mb**), soit un peu moins de la moitié du génome de *E. coli*. La séquence nucléotidique complète montra que le génome de *H. influenzae* est une molécule refermée sur elle-même, de 1 830 137 paires de bases d'ADN. On se mit alors à y chercher les gènes codant les ARNr, les ARNt et les protéines. On trouvait les gènes codant les protéines en criblant la séquence d'ADN à l'ordinateur pour y mettre en évidence les **cadres de lecture ouverts**, c'est-à-dire les longues suites nucléotidiques, qui, parce que dépourvues de tout codon de terminaison (UAA, UAG et UGA), étaient capables de coder des protéines ; comme le hasard ferait apparaître ces triplets tous les 21 codons (trois codons de terminaison sur 64 codons), tout cadre de lecture ouvert de plus d'une centaine de codons représente d'habitude un gène codant pour une protéine.

Cette étude mit en évidence dans le génome de *H. influenzae* six exemplaires de gènes d'ARNr, 54 gènes différents d'ARNt et 1 743 régions potentielles supposées coder des protéines (figure 4.20). On pu attribuer un rôle à plus de mille de ces gènes (par exemple, un enzyme du cycle du citrate) en se basant sur leur parenté avec des séquences protéiques connues, mais la fonction des autres gènes nous est encore inconnue. Comme ces

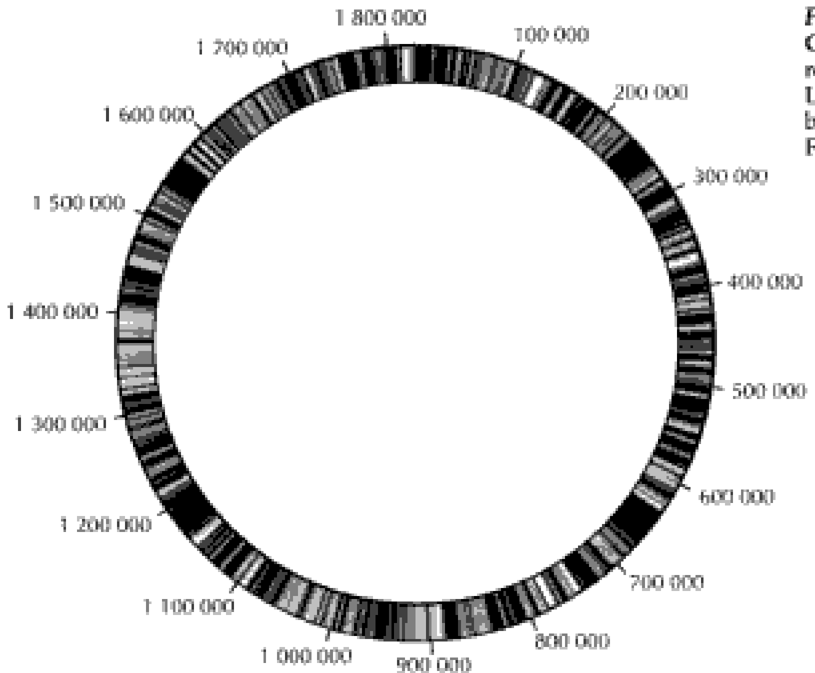


Figure 4.20
Génome de *H. influenzae*. Les traits colorés représentent les séquences codant des protéines. Les nombres indiquent le nombre de paires de bases à partir de l'origine. (D'après R. D. Fleischmann *et al.*,1995, *Science* **269** :496).

séquences codantes potentielles sont longues d'environ 900 paires de bases, leur ensemble couvre près de 1,6 Mb d'ADN ; les séquences codant les protéines correspondent donc à plus de 85 % du génome de *H. influenzae*, en accord avec les premières données qui estimaient que ces séquences occupaient la plus grande partie des génomes bactériens.

On a maintenant séquencé les génomes de *Mycoplasma genitalium*, de *Bacillus subtilis*, de *Archaeoglobus fulgidus*, de *Synechocystis*, de *Borrelia burgdorferi*, de *Rickettsia prowazekii* et d'autres encore. Les mycoplasmes présentent un grand intérêt, car ils font partie des bactéries comtemporaines les plus simples et possèdent le plus petit génome de toutes les cellules connues. Le génome de *M. genitalium* est long de 580 kb (0,58 Mb) et représenterait la série minimale des gènes nécessaires à l'autoréplication d'un organisme. L'examen de sa séquence nucléotidique montre que *M. genitalium* ne comporte que 470 séquences codant des protéines, ce qui correspond à environ 88 % de l'ADN génomique (figure 4.21). Beaucoup de ces séquences se révélèrent coder des protéines impliquées dans la réplication et la transcription de l'ADN, dans la traduction, le transport transmembranaire et le métabolisme énergétique. *M. genitalium* contient cependant beaucoup moins de gènes d'enzymes métaboliques que *H. influenzae*, ce qui confirme son métabolisme plus rudimentaire ; il est, par exemple, dépourvu des gènes codant les éléments utilisés par les voies biosynthétiques, ce qui l'oblige à emprunter ses précurseurs d'acides aminés et de nucléotides à un organisme hôte. Remarquons que *M. genitalium* possède aussi 150 gènes dont le rôle est encore inconnu. Même dans la cellule la plus simple, on ignore donc encore le rôle physiologique de bien des gènes.

Bien que la simplicité relative et la génétique accessible de *E. coli* aient fait de cet organisme un favori des biologistes moléculaires, son génome de 4,7 Mb n'a pas encore été entièrement séquencé. Néanmoins, grâce à l'analyse génétique, bien des traits du génome de *E. coli* sont connus ; chez les souches mutantes de *E. coli*, on a identifié plus de 1 400 gènes et on a trouvé leur place sur la carte chromosomique. C'est en effet en isolant une grande variété de mutants et en cartographiant leur génome qu'on a montré que le chromosome de *E. coli* est une molécule fermée sur elle-même, contraire-

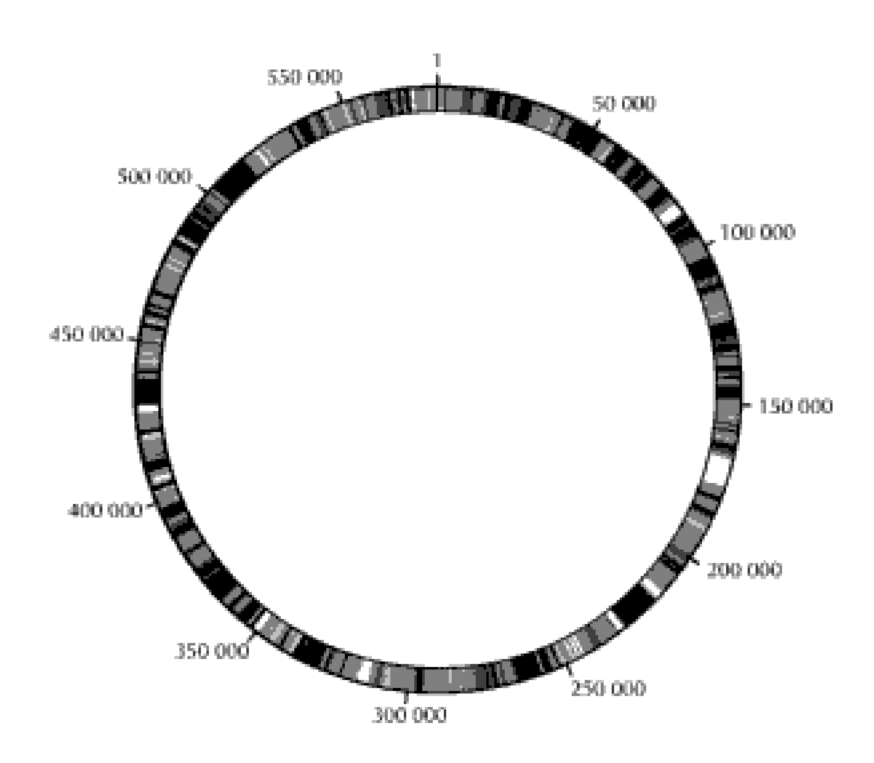


Figure 4.21
Génome de *Mycoplasma genitalium*. Les barres colorées représentent des séquences supposées coder une protéine, les nombres les paires de bases (D'après C.M. Frazer *et al.*, 1995, *Science* **270** :397).

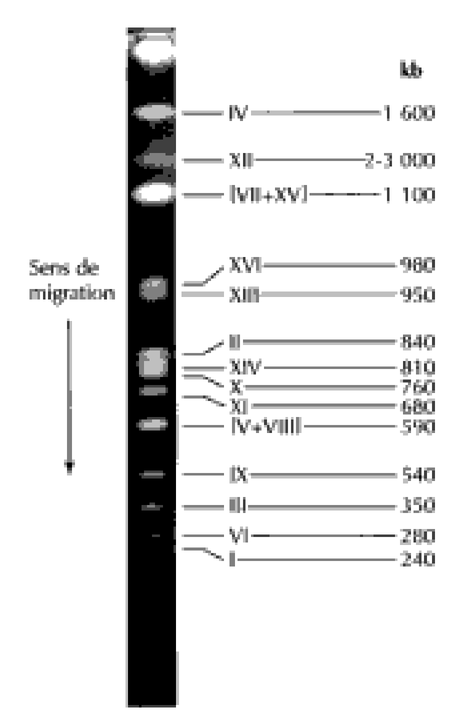


Figure 4.22
Séparation des chromosomes de levure. Résultats d'une électrophorèse en gel sous champ pulsé appliquée à un mélange des 16 chromosomes de la levure *S. cerevisiae* ; la taille de chaque chromosome est donnée en kb d'ADN. Remarquez que le plus grand des chromosomes (XII) migre de façon anormale dans les conditions utilisées. (d'après M. V. Olson, 1991, dans *The molecular and cellular Biology of the Yeast* Saccharomyces cerevisiae, de. J. R. Broach *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

ment à celles des chromosomes eucaryotiques. Comme l'ensemble des gènes codant des protéines n'y correspond cependant qu'à un tiers environ du génome, on doit s'attendre à y trouver en sus de deux à trois mille gènes dont on ignore la fonction. La fraction déjà séquencée montre qu'à peu près 85 % de l'ADN de *E. coli* consiste en régions codant des protéines. Ce pourcentage correspond à celui des séquences de *H. influenzae* et de *M. genitalium* et suggère que *E. coli* comporte environ 4 000 gènes. Aussi, même chez *E. coli*, doit-on s'attendre, en complétant le séquençage, à trouver de nouveaux gènes, qui ont échappé à une analyse génétique exhaustive.

Séquençage du génome de la levure

On a vu que le génome eucaryotique le plus simple (1, 4 x 10^7 pb d'ADN) est celui de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. En outre, les levures se multiplient rapidement et on les soumet facilement à des manipulations génétiques simples : à de nombreux points de vue, elles sont des cellules eucaryotiques dont l'étude est plus facile que celle des cellules de mammifères et des autres eucaryotes supérieurs. Aussi le déchiffrage complet de la séquence nucléotidique du génome de levure apparaît-il comme un pas critique pour appréhender la complexité génétique des eucaryotes.

Vu la taille relativement réduite du génome de la levure, on a facilement établi sa carte physique, en utilisant l'**électrophorèse en gel sous champ pulsé (EGCP)** qui permet de séparer les grandes molécules d'ADN selon leur taille. Le génome de *S. cerevisiae* comporte 16 chromosomes, dont la taille va de 240 à 2 000 kb ; grâce au pouvoir de résolution de cette méthode d'électrophorèse, on arrive à séparer entièrement l'un de l'autre chacun des ADN chromosomiques (figure 4.22). L'électrophorèse en gel d'agarose sert d'habitude à séparer les fragments d'ADN obtenus par action des endonucléases de restriction (voir figure 3.16) ; dans les conditions habituelles, ces fragments sont entraînés dans un champ électrique constant : leur séparation est due à leur vitesse propre de migration à travers les pores de la matrice du gel d'agarose. Cette méthode arrive à bien séparer les fragments d'ADN de l'ordre de 30 kb, mais ne résout pas les mélanges de molé-

cules plus longues qui, étirées sous l'effet du champ électrique, ne pénètrent pas dans les mailles du gel. Dans l'EGCP, le champ électrique n'est pas constant, il change périodiquement de sens ; ceci pousse les molécules d'ADN à se réorienter dans la direction du champ avant de continuer leur migration dans le gel. Le temps mis à se réorienter dépend de la longueur du fragment d'ADN ; les longs fragments se réorientent plus lentement que les courts, de sorte que leur migration à travers le gel est plus lente. Les changements rapides du sens du champ augmentent continuellement la distance entre les fragments de taille différente, au point que l'EGCP peut séparer des molécules d'ADN de plusieurs milliers de kb.

Une fois les chromosomes de levure séparés par EGCP, on localise à l'un d'eux chaque gène cloné, par simple hybridation à la Southern. Puisqu'on sait séparer les grandes molécules d'ADN par EGCP, on peut établir la carte de restriction de chacun des chromosomes en les digérant par *Not*I et *Sfi*I (figure 4.23). Comme ces endonucléases de restriction reconnaissent des séquences de huit paires de bases (par exemple GCGGCCGC dans le cas de *Not*I), elles ne découpent l'ADN qu'en de rares endroits, pour donner des fragments d'environ 10 kb. On obtient d'autres cartes physiques plus détaillées en analysant de nombreux clones chevauchants d'ADN de levure portés par le bactériophage λ et par des cosmides vecteurs.

Avec la carte complète et la séquence des 315 kb du chromosome III entier de la levure, un jalon fut posé en 1992 dans l'études des génomes d'eucaryotes, à savoir le code complet, jamais déchiffré, d'un chromosome (figure 4.24). Cette réussite fut suivie du séquençage complet du chromosome VIII (563 kb) et du chromosome XI (666 kb), puis couronnée tout récemment par le séquençage du génome entier de la levure (*Nature* **387**:1-105).

L'examen de la séquence du génome de levure a révélé la présence d'une densité élevée de cadres de lecture ouverts, d'une longueur moyenne d'en-

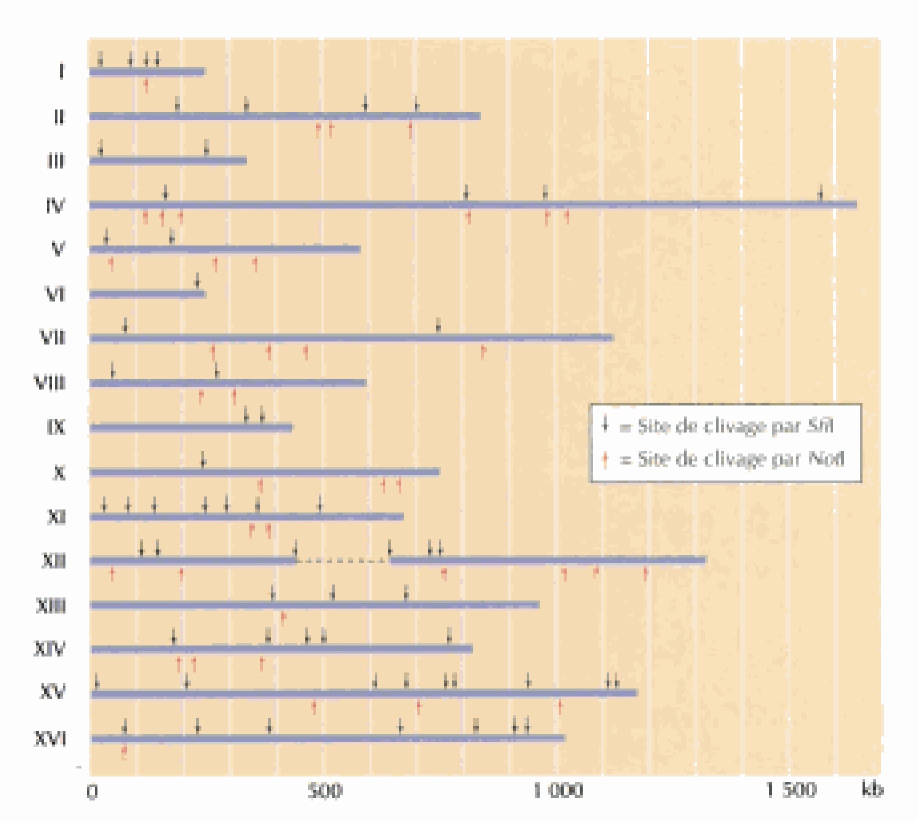


Figure 4.23
Carte de restriction des chromosomes de levure. Pour chacun des chromosomes de *S. cerevisiae*, on a indiqué la position des sites de clivage par *Sfi*I et *Not*I. La portion en pointillé du chromosome XII correspond à la région des gènes répétés codant l'ARN ribosomial, qui va de 1 000 à 2 000 kb. (D'après M. V. Olson, 1991, dans *The molecular and cellular Biology of the Yeast* Saccharomyces cerevisiae, de. J. R. Broach *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

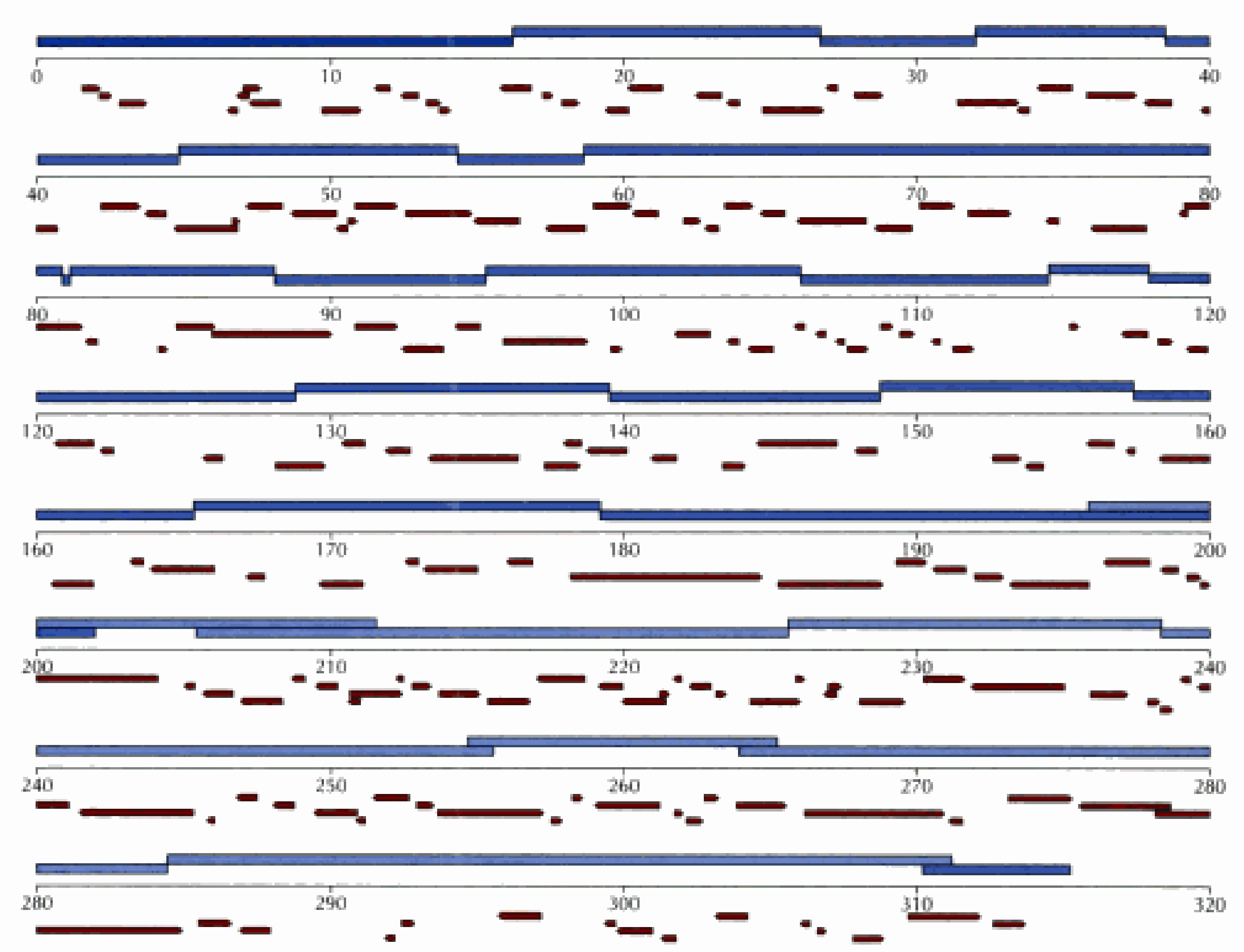


Figure 4.24
Chromosome III de la levure.
Les barres supérieures bleues désignent les clones ayant servi au séquençage, les flèches indiquent les cadres de lecture ouverts. (D'après S. G. Oliver *et al.*, 1992, *Nature* **357** :38)

viron 1,5 kb ; on en trouve, par exemple, 182 dans le chromosome III, 269 dans le chromosome VIII et 331 dans le chromosome XI. Le génome de la levure comporte en moyenne une séquence codante de protéine tous les deux kb d'ADN, de sorte que les séquences codant une protéine occupent près de 75 % du génome. D'une longueur totale de 14 Mb, le génome de levure possède en tout environ 6 000 gènes, soit à peu près le double du nombre de gènes de *E. coli*.

D'après une parenté avec des gènes déjà caractérisés, on peut attribuer une fonction à près de la moitié des gènes de levure identifiés par séquençage du génome ; aussi, ce séquençage exhaustif a-t-il révélé l'existence d'environ 3 000 gènes méconnus. La levure se prête particulièrement bien à l'étude de la fonction de gènes inconnus, vu la facilité avec laquelle on arrive à y inactiver des locus chromosomiques normaux par recombinaison homologue avec des séquences clonées (voir figure 3.42). On pourra dès lors chercher directement le rôle des gènes de levure identifiés en premier lieu par leur séquence nucléotidique. Le séquençage du génome complet de la levure permet donc d'entreprendre l'étude de nombreux domaines de la biologie de cette cellule eucaryote simple.

Génome de Caenorhabditis elegans

La taille des génomes de *C. elegans*, *Drosophila* et *Arabidopsis* est intermédiaire entre celle des génomes de levure et celle du génome de l'Homme. Certains traits particuliers à ces organismes en font des modèles essentiels

pour l'examens des génomes : *Arabidopsis* offre un modèle simplifié de génome de plante, *C. elegans* est le cheval de bataille de l'embryologie des animaux, *Drosophila* est particulièrement bien connue par les généticiens. Néanmoins, les génomes de ces organismes étant à peu près dix fois plus grands que ceux des levures, on est confronté à une difficulté d'un autre ordre quand on veut cartographier et séquencer ces génomes.

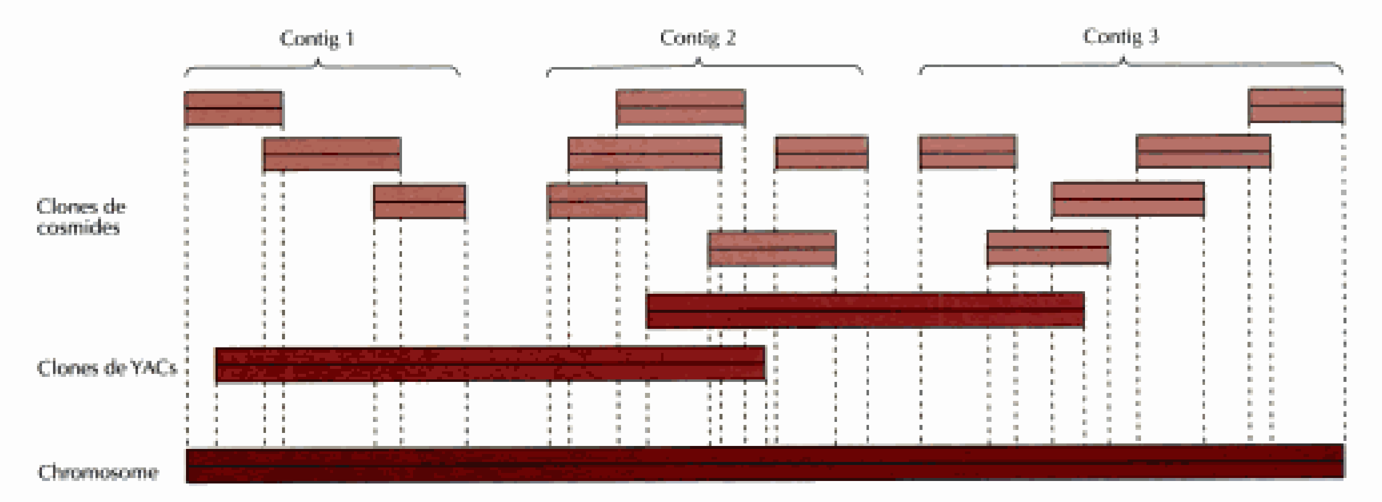
La génétique du nématode *C. elegans* est facile à débrouiller et on y a identifié à présent 1 400 gènes ; en outre, on a presque complété la carte physique du génome entier (environ 100 Mb, réparties sur 6 chromosomes). Pour dresser la carte du génome de *C. elegans*, on commença par utiliser des fragments d'ADN clonés dans des cosmides, que l'on examinait alors pour trouver des chevauchements entre les inserts d'ADN. On pouvait ensuite disposer les clones de cosmides en groupes superposés, appelés contigs (figure 4.25). Cette approche ne permit cependant pas de couvrir le génome dans sa totalité ; la mise bout à bout des clones de cosmides exigea le clonage de bien plus grands fragments d'ADN dans des vecteurs issus de **chromosomes artificiels de levure** (YAC, en anglais).

Le trait particulier aux YAC est qu'ils contiennent un centromère et des télomères, qui leur permettent de se répliquer chez la levure comme des molécules ouvertes, de type chromosomique (figure 4.26). Aussi peuvent-ils servir à cloner des fragments de la taille de l'ADN d'un chromosome de levure, c'est-à-dire des inserts longs de milliers de kilobases, alors que les cosmides n'admettent que des inserts de tout au plus 40 kb. Les grands inserts d'ADN qu'on clone dans les YAC sont des outils-clés pour dresser la carte d'un génome complexe. Dans le cas de *C. elegans*, les YAC permirent d'arranger l'une par rapport à l'autre différentes séries de contigs de cosmides, et de résoudre ainsi presque complètement la carte physique de ce génome. On verra bientôt l'importance encore plus critique des YAC quand nous discuterons de la cartographie de génomes encore plus complexes, l'humain, par exemple.

À ce jour, on a séquencé plus du cinquième du génome de *C. elegans* et on pense pouvoir achever le séquençage pour la fin de 1998 ; les données recueillies indiquent que ce génome contient environ 13 000 gènes ; la moitié des gènes déjà séquencés sont sans parenté avec les séquences déjà décrites.

Pour comprendre le développement des animaux, les embryologistes vont chercher passionnément la fonction de ces gènes inconnus. Bien que le *C. elegans* adulte ne mesure que 1 mm de long et ne comporte que 959 cel-

Figure 4.25
Carte des clones de cosmides et de YAC chez *C. elegans*. Dans l'exemple illustré ici, on a pu classer en trois groupes liants (contigs) les 13 clones de cosmides portant des inserts d'environ 40 kb chacun. L'examen de fragments d'ADN plus longs (centaines de kb) clonés dans des YAC a permis alors d'ordonner les contigs l'un par rapport à l'autre.



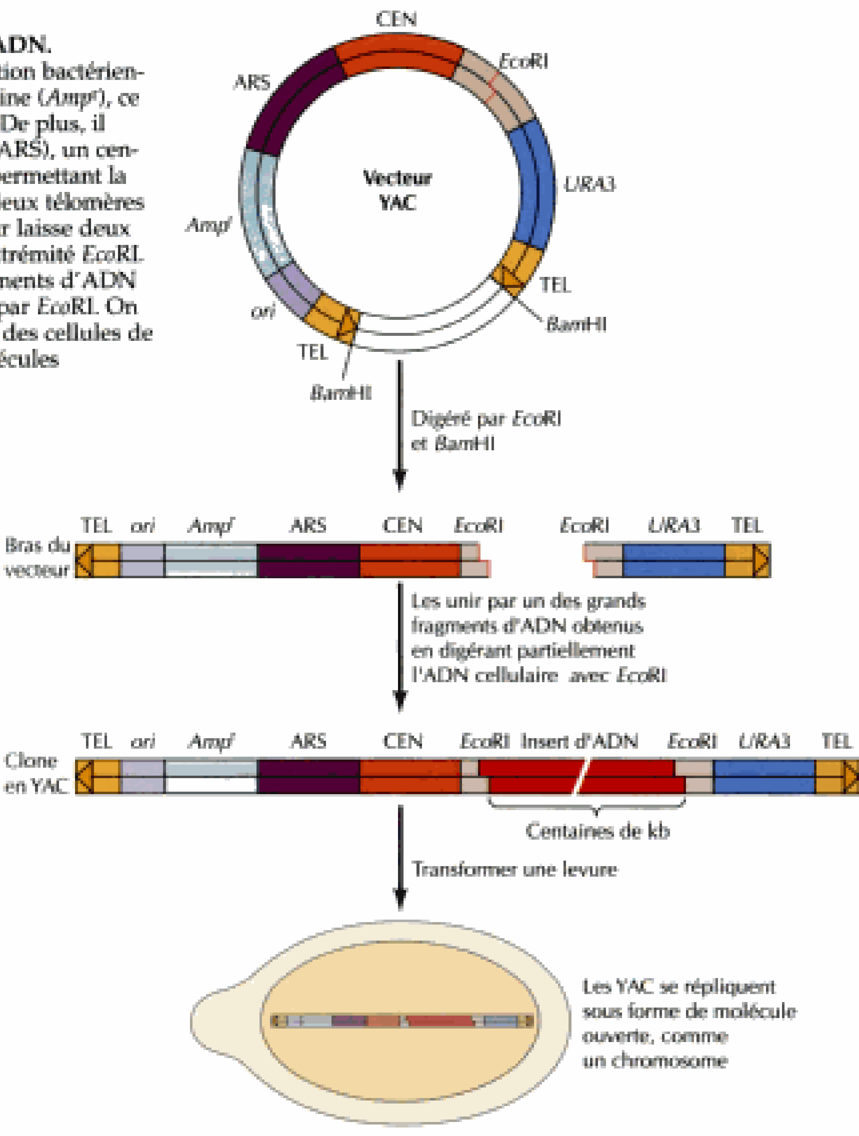


Figure 4.26
Clonage en YAC des grands fragments d'ADN.
Le vecteur comporte une origine de réplication bactérienne (*ori*) et un gène de résistance à l'ampicilline (*Amp^r*), ce qui lui permet de se multiplier chez *E. coli*. De plus, il porte une origine de réplication de levure (ARS), un centromère (CEN), un marqueur de sélection permettant la croissance en absence d'uracile (*URA3*) et deux télomères (TEL). Digéré par *Eco*RI et *Bam*HI, le vecteur laisse deux bras se terminant par un télomère et une extrémité *Eco*RI. On lie alors ces deux bras à de grands fragments d'ADN cellulaire obtenus après digestion partielle par *Eco*RI. On introduit ensuite ces YAC recombinés dans des cellules de levure, où ils se répliquent en tant que molécules ouvertes, comme le font les chromosomes.

lules somatiques, son corps comporte toutes les espèces de tissus différenciés présents chez les animaux plus complexes ; en outre, on a élucidé la façon dont les cellules embryonnaires se divisent pour former l'adulte, y compris le profil complet des connections reliant ses 302 neurones. Nombre de gènes impliqués dans le développement embryonnaire de *C. elegans* sont déjà connus par les travaux de la génétique classique ; comme on a trouvé que certains d'entre eux s'apparentaient à des gènes actifs au cours de la prolifération et de la différenciation des cellules de mammifères, *C. elegans* est assurément un bon modèle d'animal plus complexe. Le séquençage de son génome révélera certainement beaucoup d'autres gènes clés qui commandent son développement embryonnaire.

Génome de la drosophile

Le séquençage du génome de *Drosophila* illustre les atouts tirés de l'étude exhaustive de la génétique de cet organisme. Ce génome contient 1,65 x 10^8 paires de bases réparties en quatre chromosomes ; on y a identifié et cartographié, par recombinaison génétique, près de 4 000 gènes, sur un total estimé à au moins 15 000.

Le choix de *Drosophila* pour effectuer une analyse génétique découle de la simplicité relative de son génome et du fait qu'on peut facilement élever cette espèce et la faire se reproduire en laboratoire ; en outre, on profite d'un outil clé pour l'analyse génétique, à savoir la présence de **chromosomes polytènes** géants dans certains organes, comme la glande salivaire des larves, chromosomes issus de la réplication itérative, dans des cellules amitotiques, de brins d'ADN qui ne se séparent pas. Chaque chromosome polytène comporte donc des centaines de molécules d'ADN identiques alignées en regard les unes des autres ; vu leur taille, ces chromosomes polytènes sont visibles au microscope optique et une coloration adéquate y fait apparaître une striation caractéristique (figure 4.27). La striation d'un chromosome polytène est beaucoup plus fine que celle observée sur un chromosome métaphasique (voir, par exemple, figure 4.14). Tout chromosome polytène est un chromosome interphasique décondensé qui comporte des gènes bien exprimés ; on y remarque plus de 5 000 bandes, d'une étendue moyenne proche de 20 kb d'ADN, alors que les bandes reconnaissables sur un chromosome métaphasique humain contiennent plusieurs mégabases d'ADN.

Le profil de striation des chromosomes polytènes fournit donc une carte physique, à haute résolution, du génome de la drosophile, carte que l'on aligne aisément avec la carte génétique. Il arrive que l'on puisse faire concorder une délétion génétique donnée avec la perte d'une bande chromosomique déterminée, définissant ainsi la localisation physique du gène en question sur le chromosome (figure 4.28).

On peut de même situer les clones d'ADN sur le génome en les hybridant *in situ* aux chromosomes polytènes, avec une résolution telle qu'on peut souvent faire correspondre un clone d'ADN à une bande particulière (figure 4.29) ; c'est ainsi qu'on détermine la position, sur la carte, d'un clone porté par un cosmide ou par un YAC (ce dernier couvre plusieurs bandes). Le génome de *Drosophila* a été presque entièrement cloné en vecteurs YAC ou cosmides et on est près de pouvoir ordonner ces clones en une carte moléculaire complète du génome, qui servira de matériau brut pour commencer le séquençage. Grâce à la puissance de la génétique de *Drosophila*, l'identification, puis l'examen des nouveaux gènes de cet organisme feront progresser beaucoup de domaines de la biologie moléculaire et cellulaire, notamment l'étude du développement embryonnaire et de la différenciation.

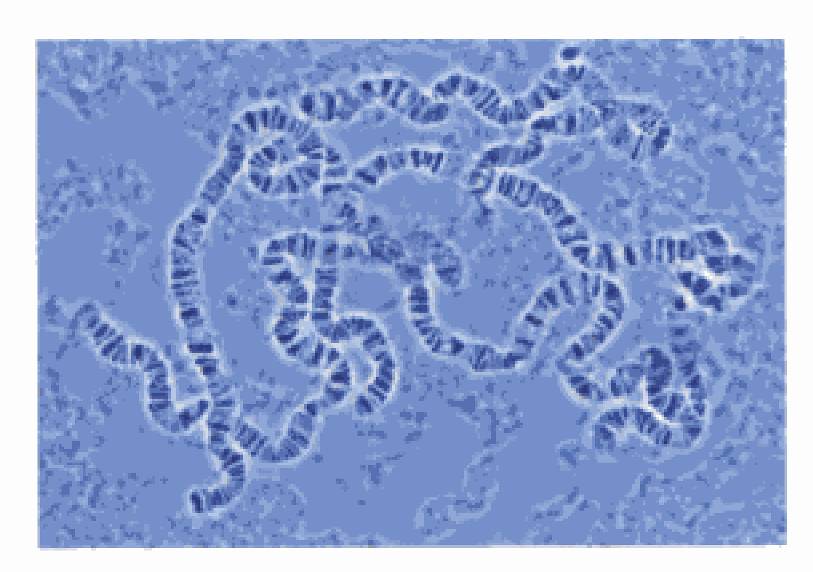


Figure 4.27
Chromosomes polytènes de la drosophile. Micrographie optique de chromosomes de glande salivaire après coloration. Les quatre chromosomes (X, 2, 3 et 4) sont unis par leur centromère. (P. J. Bryant/Biological Photo Service)

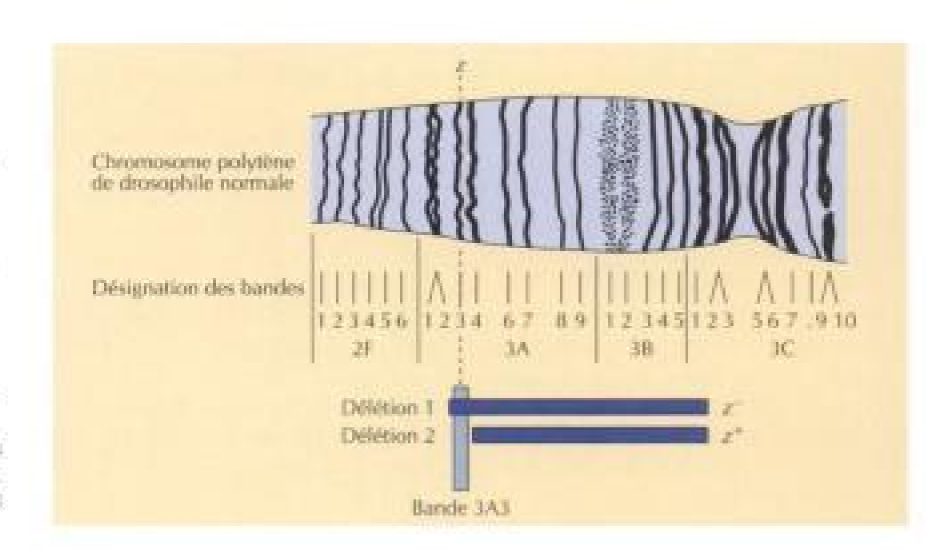
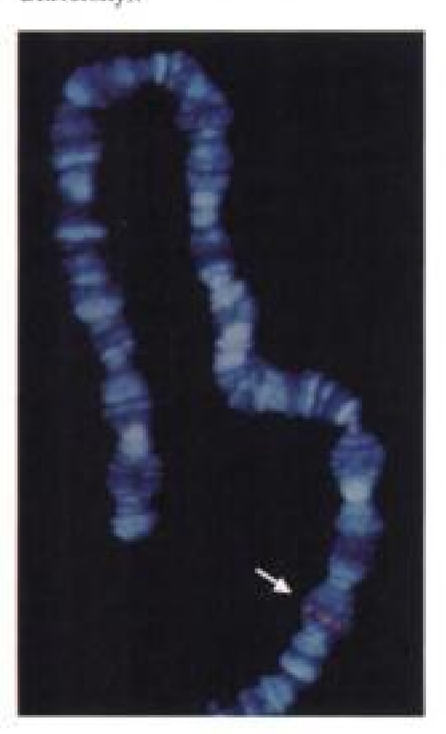


Figure 4.28
Cartographie du génome de la drosophile. L'examen des mutants par délétion permet d'attribuer certains gènes de la drosophile à telle ou telle bande d'un chromosome polytène. On a figuré ici l'attribution du gène z à la bande 3A3 du chromosome X, attribution tirée de la comparaison de deux délétions ; la délétion 1 résulte en la perte du gène z, ce n'est pas le cas de la délétion 2. L'examen des bandes des chromosomes polytènes des mouches portant ces délétions montre que la délétion 1 s'étend de la bande 3A3 à la bande 3C2, tandis que la délétion 2 va de 3A4 à 3C2. C'est pourquoi le gène z doit siéger dans la bande 3A3.

LE GÉNOME DE L'HOMME

Le but ultime de l'étude du génome est de déterminer la séquence nucléotidique complète du génome humain, long de 3×10^9 paires de bases d'ADN. On ne saisit pas l'immensité de cette entreprise (baptisée Projet de séquençage du génome humain) si on oublie que ce génome est plus de dix fois plus grand que celui de la drosophile, que le plus petit chromosome humain est plusieurs fois plus long que le génome entier de la levure et que la longueur totale de l'ADN étiré que comporte le génome humain atteint environ 1 mètre, alors que celui de la bactérie *Haemophilus influenzae*, entièrement séquencé, ne dépasse pas 1 mm. Cependant, les chercheurs pensent pouvoir raisonnablement terminer le séquençage de ce génome dans les dix prochaines années. L'identification des quelque 100 000 gènes de l'Homme va non seulement ouvrir de nouveaux horizons à la recherche, mais aura aussi, en faisant la lumière sur les bases génétiques de nombreuses maladies de l'Homme, une immense influence sur la médecine.

Figure 4.29
Hybridation *in situ* à un chromosome polytène de drosophile. On a hybridé un clone YAC à un chromosome polytène ; la zone d'hybridation est marquée d'une flèche (Gracieusement transmis par Daniel L. Hartl, Harvard University).



Cartographie du génome humain

Le génome de l'Homme est fractionné en 24 chromosomes (22 autosomes et les deux chromosomes sexuels), dont chacun comporte de 5×10^4 à 26×10^4 kb d'ADN (figure 4.30). Pour établir la carte du génome humain, la première étape consiste à assigner un gène connu à un locus chromosomique, couramment défini par une bande d'un chromosome métaphasique. Parmi les 100 000 gènes potentiels de l'Homme, on a identifié environ 6 000 gènes et on a localisé près de la moitié de ces derniers, souvent en utilisant une des trois stratégies que nous allons décrire.

La première méthode générale mise au point pour localiser un gène humain à un chromosome donné ou à une région donnée d'un chromosome fut l'**hybridation de cellules somatiques** (figure 4.31). On peut forcer des cellules en culture à fusionner entre elles en les traitant par des virus ou des agents chimiques comme le polyéthylène glycol ; les noyaux de ces cellules fusionnent également, en donnant des cellules hybrides portant les chromosomes hérités des deux cellules originelles. On peut créer ces hybrides non seulement entre cellules d'une même espèce, mais aussi entre cellules d'espèces différentes, par exemple, Homme et souris. Remarquons que, dans ces hybrides Homme-souris, les chromosomes humains sont instables et disparaissent progressivement dans les hybrides en culture ; ainsi obtient-on des cellules hybrides dotées seulement d'un ou de quelques chromosomes humains, parfois même de quelques fragments de

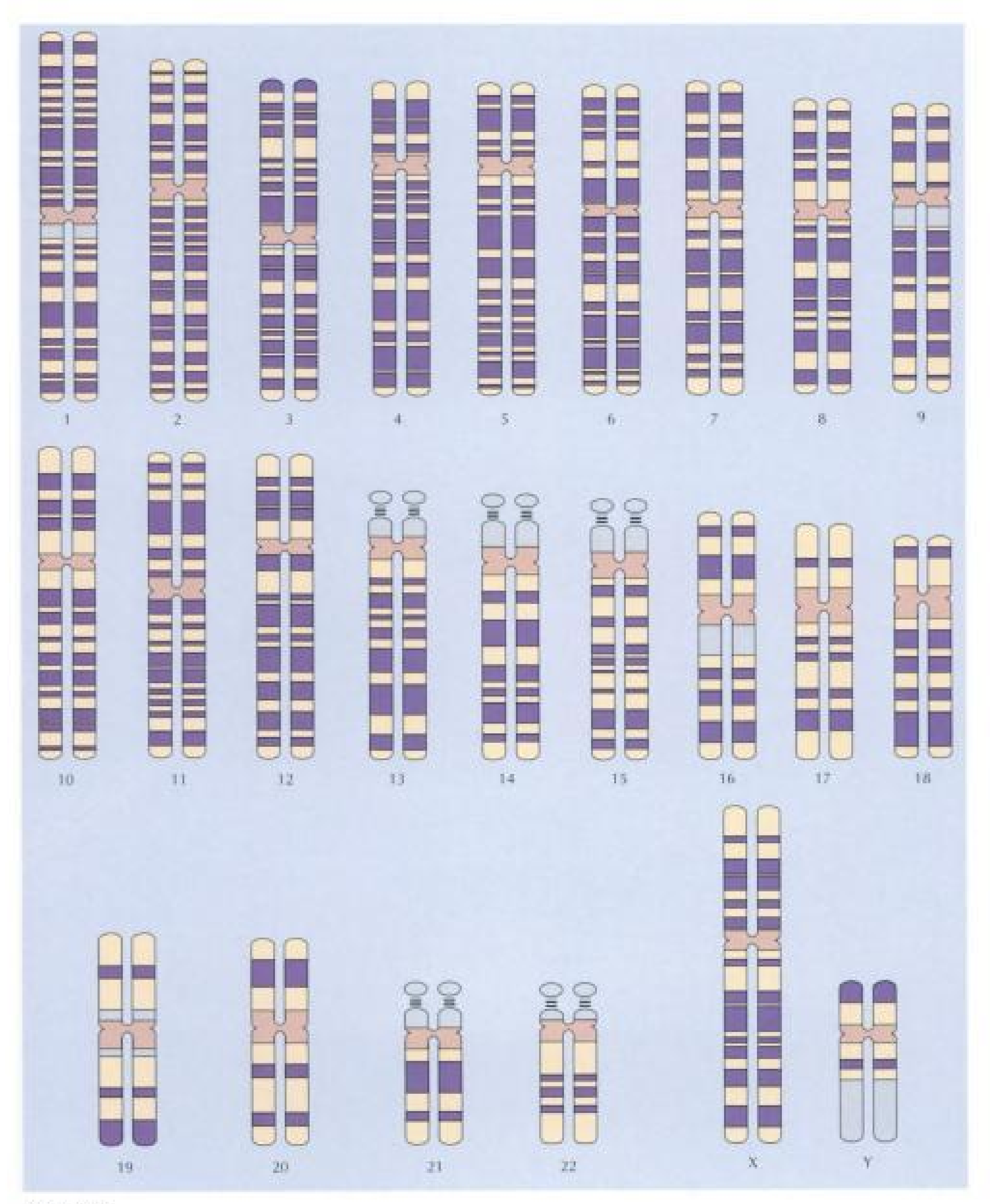
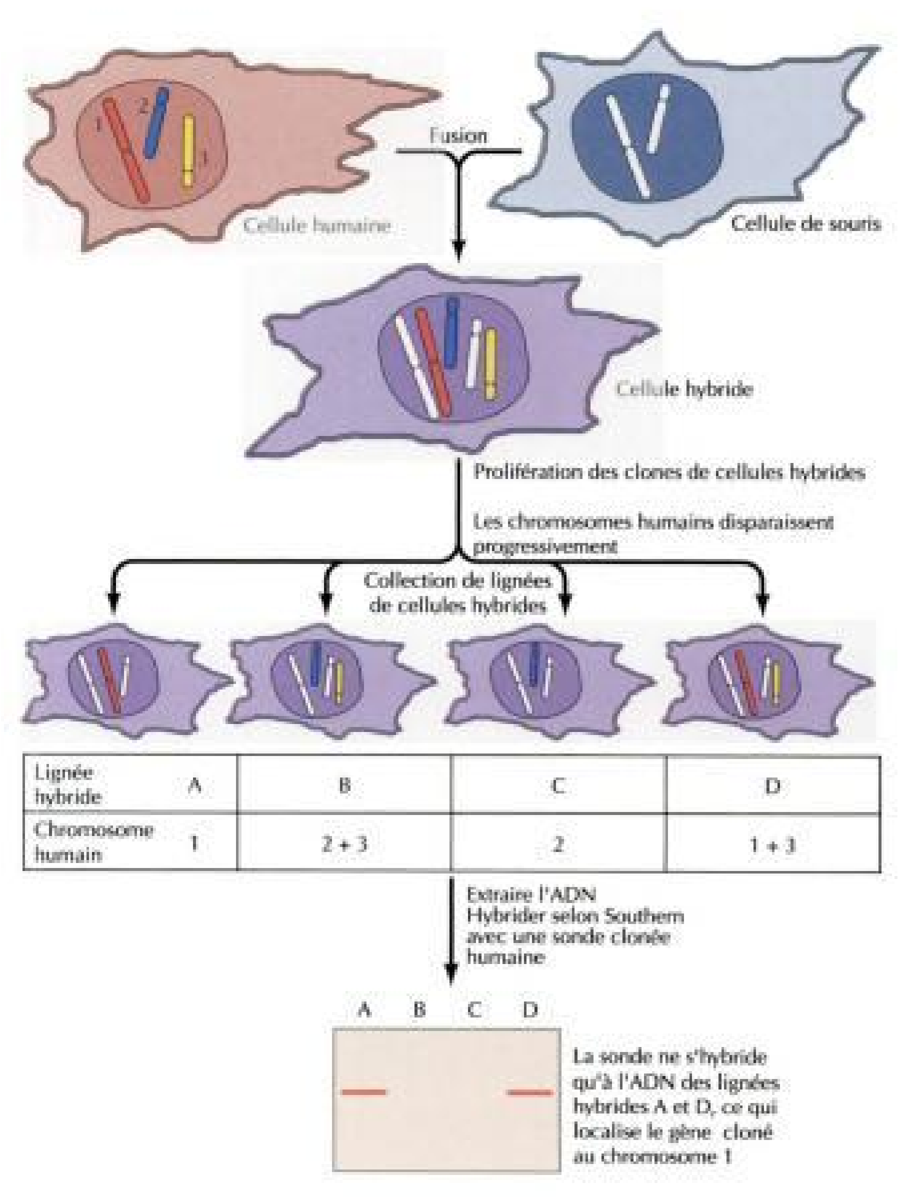


Figure 4.30
Chromosomes de l'Homme. Schéma des chromosomes métaphasiques de l'Homme avec leur striation révélée par coloration cytogénétique.

chromosomes. Pour attribuer un gène à un locus chromosomique, il faut alors cribler un lot d'hybrides de ces cellules somatiques comportant différentes séries de chromosomes humains ; ainsi suffit-il d'hybrider un gène humain cloné aux ADN extraits des membres de cette série d'hybrides cellulaires pour assigner ce gène à un chromosome déterminé (figure 4.31).

On sait localiser avec plus de précision un gène cloné sur un chromosome grâce à l'hybridation *in situ* sur les chromosomes, d'habitude en employant des sondes fluorescentes–méthode appelée couramment **hybridation *in situ* en fluorescence** (**FISH** en anglais). En hybridant *in situ* à des chromosomes métaphasiques, on arrive à attribuer un gène cloné donné à un locus défini par une bande chromosomique (figure 4.32). Bien que cette méthode arrive à une résolution supérieure à celle obtenue par examen des hybrides cellulaires, chaque bande de chromosome métaphasique comporte pourtant des milliers de kb d'ADN. Aussi l'hybridation *in situ* aux chromosomes métaphasiques est-elle incapable de fournir l'information cartographique fine obtenue par hybridation aux chromosomes polytènes de *Drosophila*, laquelle arrive à localiser un gène à une bande de chromosome interphasique de seulement 10 à 20 kb d'ADN. Chez l'Homme, on peut



Lignée hybride	A	B	C	D
Chromosome humain	1	2 + 3	2	1 + 3

Figure 4.31
Hybridation de cellules somatiques. On fusionne entre elles des cellules de souris et des cellules humaines en culture en les traitant par un virus ou par un agent chimique et on obtient une cellule hybride contenant des chromosomes humains et de souris (on n'a représenté ici que trois chromosomes humains et deux chromosomes de souris). Chez ces hybrides, les chromosomes humains sont instables et disparaissent de-ci de-là à mesure que chacun des clones hybrides prolifère. On obtient donc un éventail de cellules hybrides, dont chacune contient un assortiment différent de chromosomes humains. En hybridant un gène cloné aux ADN extraits de chacune des lignées hybrides, on le localise à un chromosome humain particulier. Ici, une sonde humaine s'hybride aux ADN des lignées A et D, pas à ceux des lignées B et C ; comme le chromosome 1 n'est présent que dans les lignées hybrides A et D, c'est donc que le gène cloné n'est porté que par ce chromosome.

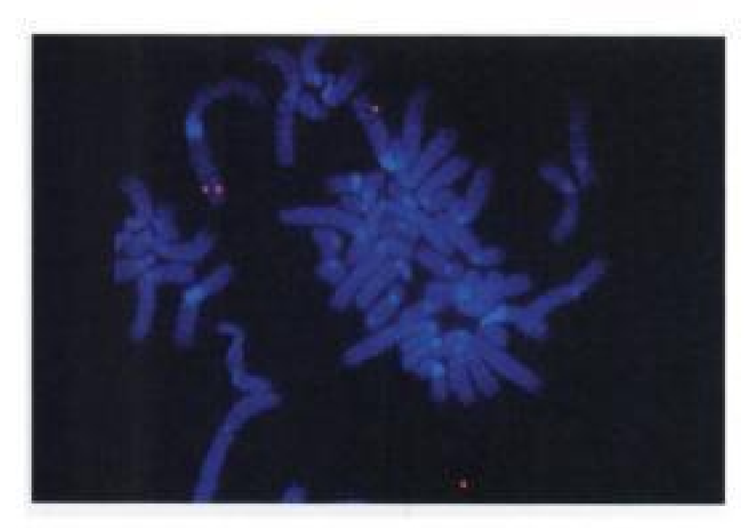


Figure 4.32
Hybridation *in situ* par fluorescence. On hybride une sonde fluorescente du gène codant le récepteur de lamine B à un étalement de chromosomes métaphasiques humains colorés (en bleu). La fluorescence rouge révèle le signal ponctuel d'hybridation d'un seul gène. (Aimablement communiqué par K. L. Wyder et J. B. Lawrence, University of Massachusetts Medical Center)

néanmoins augmenter la résolution en hybridant la sonde à des chromosomes plus étirés, comme ceux des cellules en prométaphase ou en interphase ; avec une sonde fluorescente hybridée *in situ*, un gène cloné peut être localisé à une région d'environ 100 kb.

On arrive aussi à situer un gène par un examen des liaisons génétiques, qui évalue la distance entre gènes d'après la fréquence des recombinaisons (voir figure 3.5). Les études de liaison servirent d'abord à localiser des gènes sur les quatre chromosomes de la drosophile, puis furent appliquées à la cartographie de divers organismes, y compris *E. coli*, *S. cerevisiae*, *C. elegans* ainsi que la souris. Cependant, pour établir des cartes de liaison génétique très détaillées, il faut isoler des centaines de mutations simples de gènes, puis examiner à fond leur transmission héréditaire par des expériences d'élevage programmé. Si cette approche s'applique à toute une variété d'organismes modèles, il est bien entendu interdit de l'appliquer directement à l'Homme. On résolut néanmoins ce problème dès qu'on s'aperçut qu'il était possible d'utiliser, comme marqueurs génétique chez l'Homme, aussi bien n'importe quelle différence de séquence d'ADN mise à jour entre deux individus que les mutations d'un gène. Ce moyen élargit de façon notable l'éventail de marqueurs du génome humain et permit l'analyse des fréquences de recombinaison dans de petits groupes familiaux, prélude à l'établissement d'une carte génétique complète du génome humain.

Les premières séquences utilisées comme marqueur génétique furent choisies sur base de différences congénitales dans les sites de restriction envers les endonucléases. Il suffit qu'une seule base de ces sites ait été changée pour que ce site puisse servir de marqueur génétique facile à trouver, car le site ainsi muté est devenu insensible à l'enzyme en question. On peut retrouver deux chromosomes différant par ce type de mutation, en examinant le **polymorphisme de longueur des fragments de restriction (PLFR)**, dû à ce qu'un certain site de restriction présent sur une molécule d'ADN est absent de la molécule d'ADN homologue (figure 4.33). Toute mutation qui produit un PLFR est donc un marqueur génétique, qu'on trouve en hybridant selon Southern, à une sonde appropriée, de l'ADN digéré par une endonucléase de restriction choisie.

On a identifié facilement maints PLFR par hybridation de sondes clonées à des fractionnements selon Southern de l'ADN d'une série d'individus, ADN découpé au préalable par une endonucléase de restriction. Ces PLFR fournissent un grand choix de marqueurs qui peuvent servir à construire des cartes de liaison après examen d'un nombre limité de familles ; ainsi, d'après la transmission de 393 PLFR dans 21 familles constituées chacune des grands parents, des parents et des enfants, a-t-on pu construire en 1987 la première carte complète de liaison du génome humain.

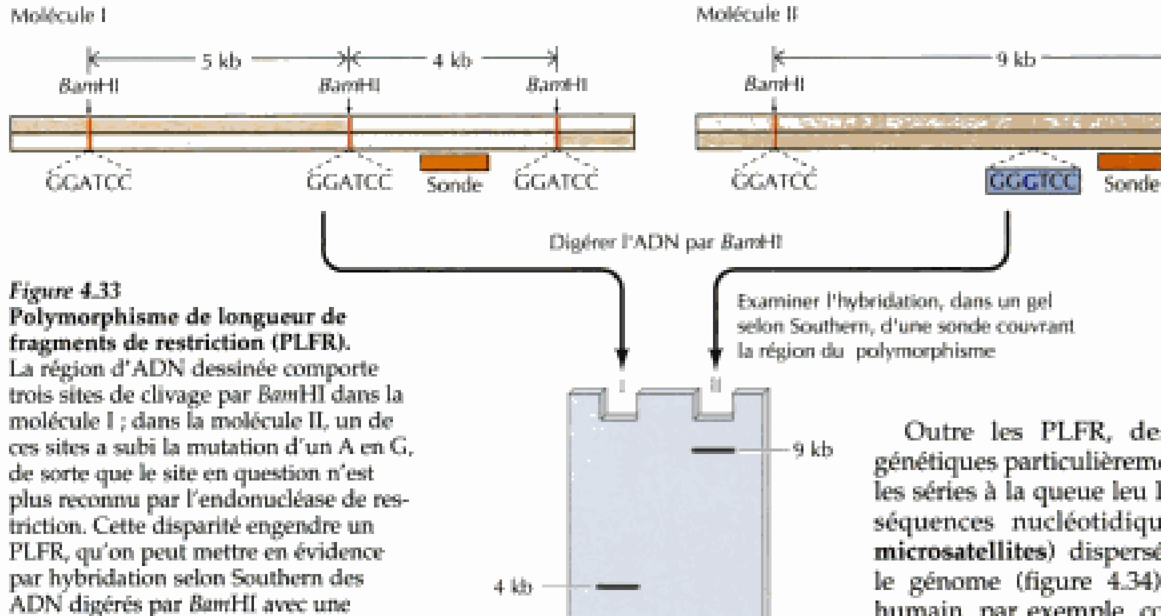


Figure 4.33
Polymorphisme de longueur de fragments de restriction (PLFR). La région d'ADN dessinée comporte trois sites de clivage par *Bam*HI dans la molécule I ; dans la molécule II, un de ces sites a subi la mutation d'un A en G, de sorte que le site en question n'est plus reconnu par l'endonucléase de restriction. Cette disparité engendre un PLFR, qu'on peut mettre en évidence par hybridation selon Southern des ADN digérés par *Bam*HI avec une sonde issue de la région où siège le polymorphisme. Dans l'ADN I, la sonde s'hybride à un fragment *Bam*HI de 4 kb, mais, dans l'ADN II, la sonde s'hybride à un fragment *Bam*HI de 9 kb, car l'un des sites *Bam*HI y a disparu.

Outre les PLFR, des marqueurs génétiques particulièrement utiles sont les séries à la queue leu leu de courtes séquences nucléotidiques (appelées **microsatellites**) dispersées dans tout le génome (figure 4.34). Le génome humain, par exemple, comporte environ 100 000 éléments de ce type de répétition du dinucléotide CA. Comme le nombre de répétitions de CA en un quelconque locus varie d'individu à individu, toute différence dans le nombre de ces répétitions sert de marqueur génétique. On sait évaluer facilement ces variantes par la méthode PCR, en choisissant des amorces mimant les séquences flanquantes, ce qui facilite l'utilisation des microsatellites comme marqueurs génétiques. La carte de liaison actuelle du génome humain consiste en plus de 5 000 locus (définis à la base par le

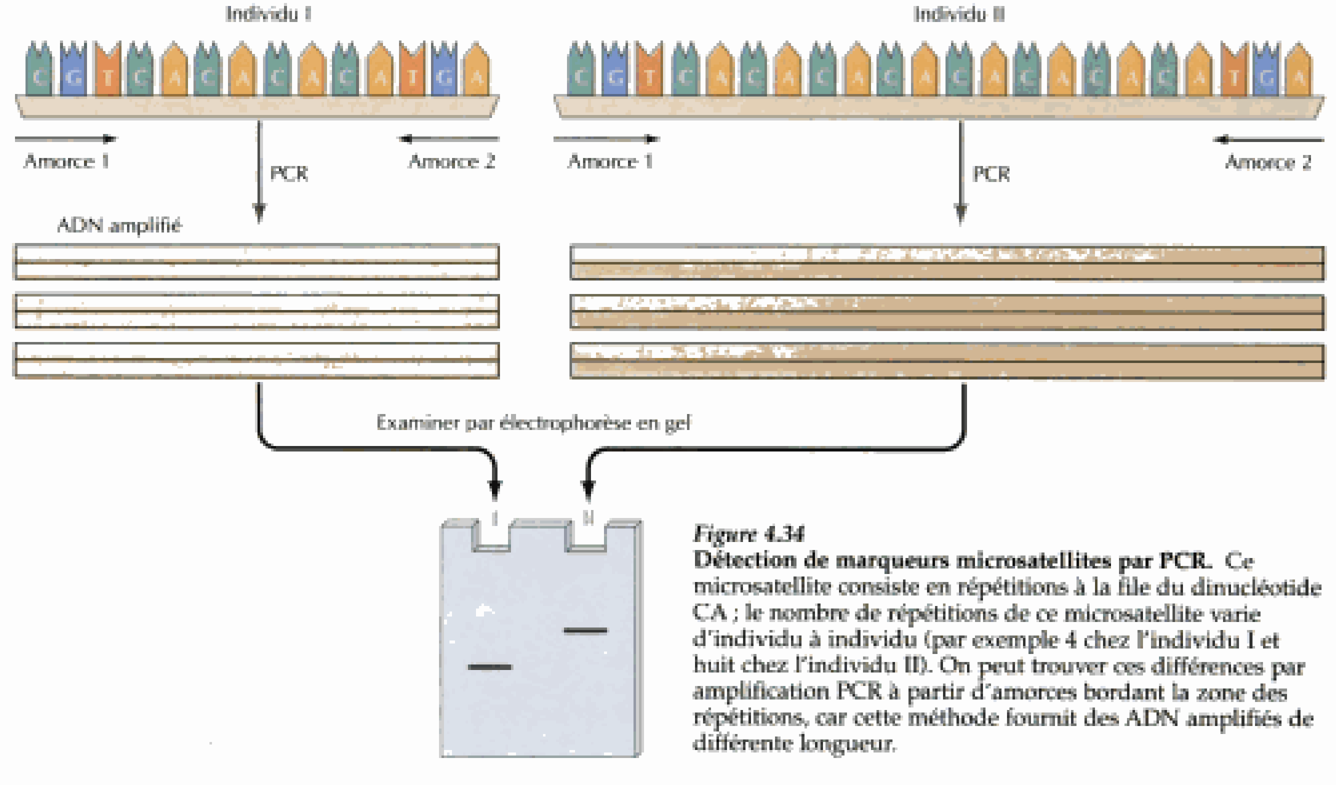


Figure 4.34
Détection de marqueurs microsatellites par PCR. Ce microsatellite consiste en répétitions à la file du dinucléotide CA ; le nombre de répétitions de ce microsatellite varie d'individu à individu (par exemple 4 chez l'individu I et huit chez l'individu II). On peut trouver ces différences par amplification PCR à partir d'amorces bordant la zone des répétitions, car cette méthode fournit des ADN amplifiés de différente longueur.

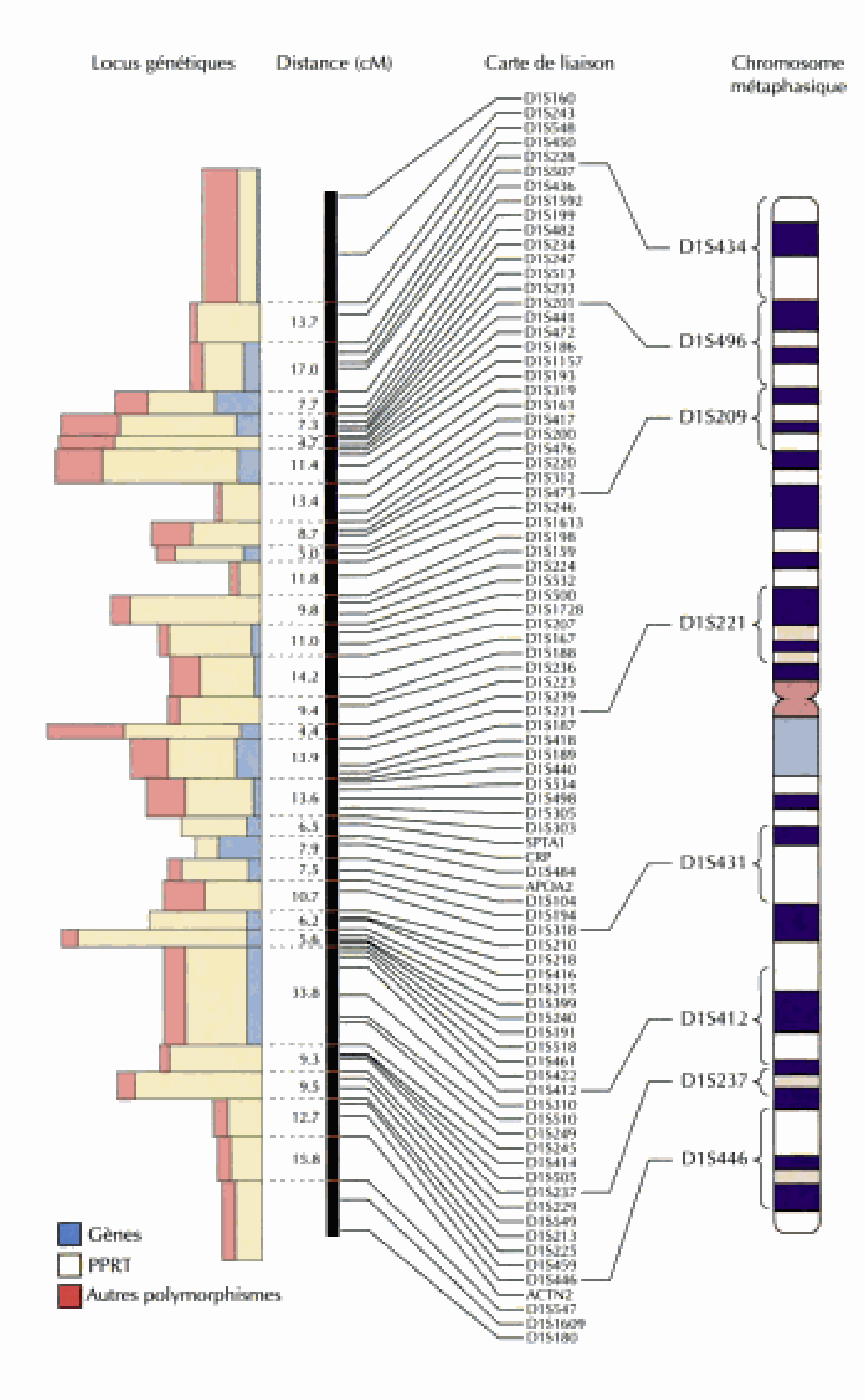


Figure 4.35
Carte de liaison du chromosome 1 de l'Homme. La carte génétique de liaison se compose de locus portant des polymorphismes dans les petites répétitions en tandem (PPRT), à côté des distances entre marqueurs indiquées par la fréquence de recombinaison (en centimorgan, ou cM). Un centimorgan correspond à environ 1 Mb d'ADN humain. À droite, on a indiqué la corrélation entre la carte génétique de liaison et les bandes du chromosome métaphasique. L'histogramme de gauche indique combien de gènes, PPRT et autres polymorphismes on a assigné à chaque intervalle de la carte (D'après Cooperative Human Linkage Centre *et al.*, 1994. Human Genetic Map : Genome Map V. *Science* **265** :2055).

polymorphisme des courtes répétitions en tandem), séparés les uns des autres par une distance moyenne de moins de 1 Mb d'ADN (figure 4.35).

Des marqueurs tels que les PLFR et le polymorphisme des petites répétitions en tandem (PPRT) une fois positionnés, ils servent de marqueurs de repère pour cartographier d'autres gènes ; on peut donc ainsi déterminer la position de n'importe quel gène humain en examinant sa liaison à ces séquences d'ADN polymorphes. La plus importante application de cette approche fut l'établissement de la carte génétique et le clonage consécutif de gènes responsables de maladies congénitales de l'Homme. C'est l'isole-

ment de ces gènes déficitaires humains qui a donné à la recherche l'impulsion pour cartographier et séquencer le génome humain. La stratégie de départ pour trouver la position d'un gène sur la carte est d'examiner une série de marqueurs de polymorphisme (par exemple, les PLFR) dans des familles atteintes de la maladie congénitale à laquelle on s'intéresse (figure 4.36). La liaison génétique entre un PLFR et le gène pathologique se révèle alors par la co-transmission de la maladie et du marqueur PLFR chez les membres de la famille qui souffrent de la maladie. Si ce PLFR a été localisé à un locus chromosomique, cette analyse de liaison livre la position que le gène pathologique occupe sur un chromosome humain.

Dès qu'on connaît la position d'un gène sur la carte, on se sert de cette information pour isoler le gène sous forme de clone moléculaire–une stratégie appelée **clonage positionnel**. C'est ainsi qu'on a pu cloner les gènes de plusieurs maladies humaines, le gène de la mucoviscidose en premier lieu. La mucoviscidose est une maladie congénitale qui touche environ un nouveau-né sur 2 500 chez les caucasiens, mais est plus rare dans les autres races. Le diagnostic est établi dans l'enfance et la maladie est fatale avant l'âge de 30 ans, la plupart des patients mourant de complications respiratoires. On déduisit d'abord la place du gène de la mucoviscidose par sa liaison à un PLFR, localisé sur le chromosome 7 (figure 4.37), puis d'autres détails cartographiques établirent que ce gène est encadré par deux PLFR séparés par environ 1 Mb. De cette région d'ADN, on isola des clones moléculaires en utilisant comme sondes les PLFR appropriés ; ces clones servirent ensuite eux-mêmes de sondes pour retrouver les clones couvrant la région portant le gène de la mucoviscidose. L'examen de ces clones génomiques, suivi du clonage et du séquençage de l'ADNc permit ensuite d'identifier un gène candidat qui couvre plus de 250 kb d'ADN et est transcrit en un ADNc de 6 kb comportant 24 exons. Le séquençage de cet ADN

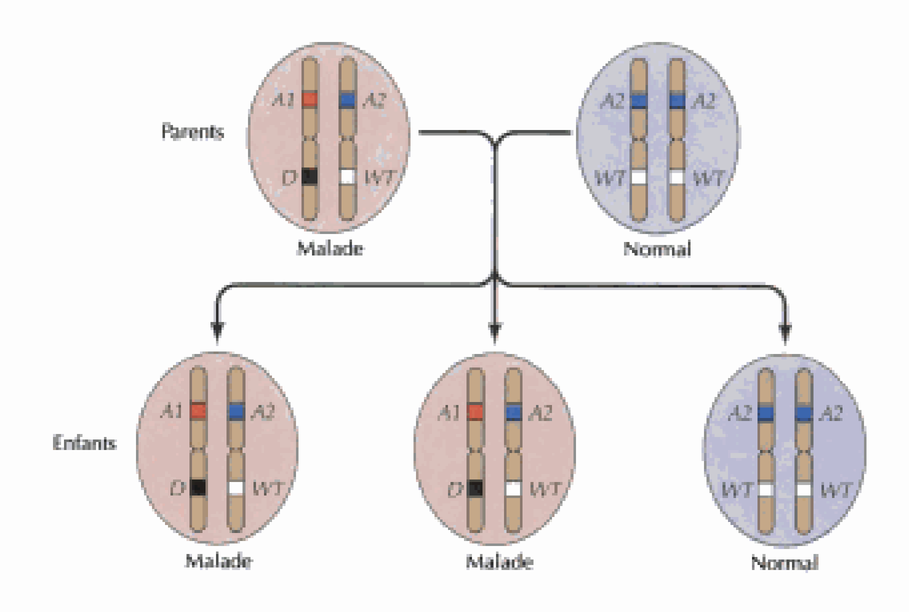


Figure 4.36
Liaison d'un gène de pathologie humaine à un PLFR. Ici, l'allèle responsable de l'apparition de la maladie (*D*) est dominant envers l'allèle de type sauvage (*WT*), de sorte que les individus porteur d'un exemplaire *D* sont touchés (fond rose). Le gène affecté est lié à un PLFR défini par deux allèles (*A1* et *A2*) qu'on distingue par hybridation selon Southern. Dans la famille étudiée ici, le parent malade est hétérozygote pour le PLFR (*A1*/*A2*), tandis que le parent normal est homozygote à ce locus (*A2*/*A2*). Deux enfants héritent du gène muté, un autre du gène de type sauvage. L'examen des PLFR des ADN montre alors que seuls les deux enfants malades ont hérité *A1* de leur parent malade, ce qui démontre la liaison génétique de *A1* avec *D*.

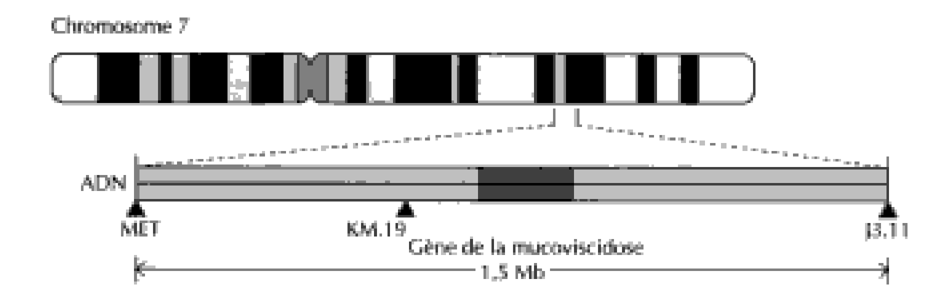


Figure 4.37
Gène de la mucoviscidose. La liaison de ce gène aux PLFR MET et J3.11 ont permis de le localiser à la région du chromosome 7 indiquée, qu'on put ensuite préciser en criblant pour un autre PLFR désigné KM.19. Le gène de la mucoviscidose, long d'environ 250 kb, fut isolé ensuite par clonage positionnel.

apporta la preuve que ce gène est celui de la mucoviscidose puisqu'il s'avéra muté chez les individus porteurs de l'affection.

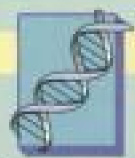
L'isolement de gènes responsables de maladies humaines a des implications importantes non seulement pour saisir les bases moléculaire et cellulaire des maladies, mais aussi dans leur prévention et leur traitement. L'avantage immédiat du clonage du gène responsable d'une maladie congénitale est de pouvoir mettre au point des tests de diagnostic sensibles reconnaissant les allèles mutants du gène, notamment la détection des mutations par la méthode PCR. Ces tests arrivent à identifier les sujets à risque et, au moins pour certaines pathologies, à instaurer des mesures préventives avant que la maladie ne se développe. En outre, la faculté de déceler les allèles mutants de gènes défectifs rend possible un diagnostic prénatal qui empêche la maladie de se transmettre aux descendants ; on sait identifier les couples porteurs d'allèles mutants et suivre la grossesse pour trouver si le gène mutant s'est transmis au fœtus. Vu la sensibilité de la méthode PCR, on arrive même à détecter les mutations chez le jeune embryon obtenu par fécondation *in vitro*, avant de l'introduire dans l'utérus d'accueil.

Outre ces applications diagnostiques, le clonage de gènes défectifs suggère qu'on pourrait arriver à une **thérapie génique** pour corriger le défaut. Pour ce faire, on envisage d'introduire l'allèle normal d'ADNc dans les cellules touchées du patient ; dans certains cas, on peut introduire le gène dans des cellules cibles (par exemple, des lymphocytes) que l'on maintient en culture avant de les rendre au patient. Sinon, on utilisera des vecteurs appropriés pour introduire des gènes dans certains types de cellules *in vivo*. Ainsi, les essais de thérapie génique de la mucoviscidose tentent d'évaluer l'utilisation d'aérosols pour cibler des vecteurs viraux aux cellules épithéliales tapissant les voies respiratoires. À ce stade purement expérimental, la thérapie génique n'en est encore qu'à ses balbutiements, mais ses progrès laissent entrevoir le succès de cette approche et suggèrent que la thérapie génique pourrait devenir une méthode importante pour traiter au moins certaines maladies humaines.

Cartographie physique du génome humain

Une carte physique des segments d'ADN clonés est un jalon nécessaire entre la carte génétique et la séquence nucléotidique du génome humain. Vu la grande taille de ce génome, les YAC sont les vecteurs rêvés pour établir la carte physique de l'ADN humain cloné. Les marqueurs les plus utiles pour examiner ces clones se sont révélés être les **sites à séquence étiquetée** (**STS** ou **SSE**), que l'on retrouve aisément par l'analyse PCR. Les STS sont de courts segments d'ADN non répété (couramment de 200 à 500 pb) dont on connaît la séquence nucléotidique ; beaucoup de STS, placés chacun en un site singulier dans le génome, peuvent donc être définis. Comme un STS donné correspond à un segment d'ADN séquencé, on le retrouve par amplification PCR, avec les amorces appropriées, dans n'importe quel ADN (figure 4.38). La facilité de détection offre un avantage considérable sur les

MÉDECINE MOLÉCULAIRE



Thérapie génique dans la déficience en adénosine désaminase

Pathogénie

Le déficit en adénosine désaminase est en partie responsable d'un déficit immunitaire combiné sévère (SCID en anglais), qui comprend une série de maladies congénitales dans lesquelles les lymphocytes sont déficitaires ; les diverses fonctions immunitaires des patients sont toutes atteintes. La SCID est rare, avec une fréquence de un sur un million. À cause de cette profonde invalidité du système immunitaire, les enfants atteints par cette maladie souffrent d'infections récurrentes par divers pathogènes, dont des virus, des bactéries, des champignons et des protozoaires ; non traités, ils en meurent en général avant l'âge de deux ans.

Bases moléculaire et cellulaire

Près de 20 % des cas de SCID sont dus à un déficit en adénosine désaminase, l'enzyme qui catalyse la désamination des adénosine et désoxyadénosine. En l'absence d'enzyme, la désoxyadénosine s'accumule dans les tissus et fait monter le taux de son triphosphate (dATP) à des niveaux toxiques pour les cellules en prolifération, puisque ce triphosphate inhibe la ribonucléotide réductase, indispensable à la synthèse des quatre triphosphates de désoxyribonucléoside ; c'est pourquoi les concentrations élevées de dATP empêchent la synthèse d'ADN. Bien que toutes les cellules possèdent de l'adénosine désaminase, une réduction de son activité est particulièrement toxique dans les lymphocytes, qui sont dépourvus d'enzymes qu'on trouve dans les autres cellules, notamment ceux qui, en détruisant le dAMP, empêchent l'accumulation de dATP. Toute déficience en adénosine désaminase bloque donc spécifiquement la réplication dans les lymphocytes et s'oppose au développement d'un système immunitaire fonctionnel.

Prévention et traitement

Certains enfants déficients en adénosine désaminase seront guéris par une transplantation de moelle, réussie pourvu qu'on trouve une moelle compatible chez un jumeau antigéniquement identique. Dans d'autres cas, on traite les patients en leur donnant un enzyme de substitution par injection intraveineuse ; si ce traitement est bénéfique, il ne guérit pas. C'est pourquoi la thérapie génique convient bien au traitement de la déficience en adénosine désaminase.

En 1990, après des études préliminaires chez l'animal, on tenta le premier traitement clinique par thérapie génique chez deux enfants atteints de cette maladie. On leur préleva des lymphocytes que l'on força à se multiplier en culture. On introduisit alors dans ces lymphocytes un ADNc actif d'adénosine désaminase porté par un rétrovirus, puis ces lymphocytes traités furent réintroduit dans le sang des patients ; on répéta ce traitement 11 ou 12 fois sur un laps de temps de deux ans. Après quatre ans d'observation, on montra que le vecteur avait bien été transféré aux lymphocytes et

Adénosine désaminase
Désoxyadénosine
Désoxyinosine
dAMP
dATP
Inhibition de la ribonucléotide réductase et de la synthèse d'ADN

Métabolisme de la désoxyadénosine

Thérapie génique dans la déficience en adénosine désaminase (suite)

s'y trouvait encore deux ans après la dernière injection. En outre, cette thérapie génique avait fait monter le nombre de lymphocytes sanguins et amélioré la fonction immunitaire ainsi que l'état clinique des deux enfants. Le résultat de ce traitement pionnier confirme donc l'efficacité de la thérapie génique dans cette maladie.

Référence

Blaese, R. M. *et al.* 1995. T-lymphocytes-directed gene therapy for ADA⁻ SCID : Initial results after 4 years. *Science* **270** :475-480.

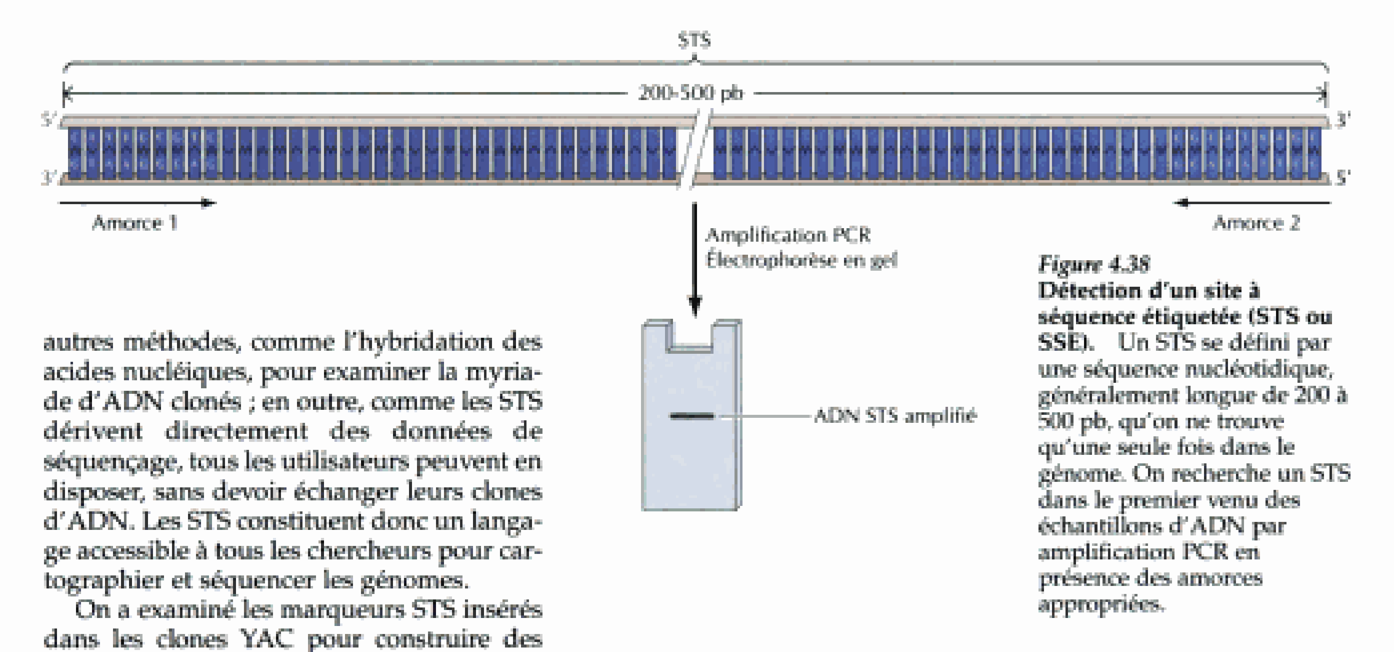


Figure 4.38
Détection d'un site à séquence étiquetée (STS ou SSE). Un STS se défini par une séquence nucléotidique, généralement longue de 200 à 500 pb, qu'on ne trouve qu'une seule fois dans le génome. On recherche un STS dans le premier venu des échantillons d'ADN par amplification PCR en présence des amorces appropriées.

autres méthodes, comme l'hybridation des acides nucléiques, pour examiner la myriade d'ADN clonés ; en outre, comme les STS dérivent directement des données de séquençage, tous les utilisateurs peuvent en disposer, sans devoir échanger leurs clones d'ADN. Les STS constituent donc un langage accessible à tous les chercheurs pour cartographier et séquencer les génomes.

On a examiné les marqueurs STS insérés dans les clones YAC pour construire des cartes physiques tant de chacun des chromosomes que du génome entier de l'Homme. Pour établir la carte d'un chromosome donné, on commence par cribler les banques YAC d'ADN humain pour y trouver les clones YAC porteurs de marqueurs STS dérivés du chromosome en question ; ainsi, la cartographie du chromosome 21 utilisa 198 STS pour cribler plus de 70 000 clones YAC contenant chacun un insert d'une taille moyenne de 470 kb. Ce procédé identifia 810 YAC portant des inserts dérivés du chromosome 21 ; en alignant ensuite les STS de ces YAC, on obtint une suite chevauchante de clones YAC qui couvraient tout le chromosome (figure 4.39).

D'autre part, on s'est servi de marqueurs STS et d'autres marqueurs physiques pour cartographier tout un éventail de clones YAC couvrant la totalité du génome. En criblant ensuite ces clones avec des marqueurs connus, on a pu construire une carte composite, physique et génétique, couvrant tous les chromosomes humains, c'est-à-dire le matériau de départ approprié au séquençage.

Une autre voie d'examen du génome entier fut de s'adresser aux séquences codant une protéine, autrement dit de séquencer les ADNc ; en

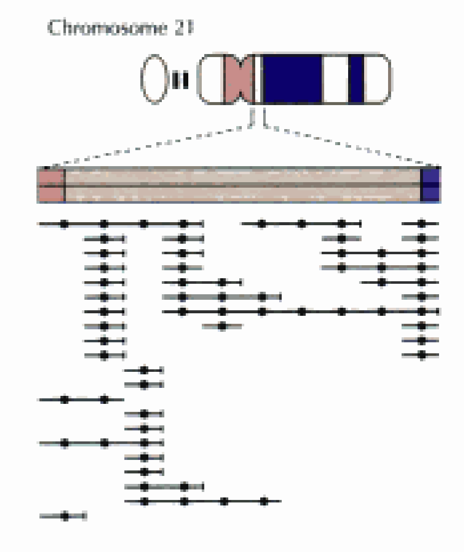


Figure 4.39
Carte physique du chromosome humain 21. On a aligné, à l'aide de marqueurs STS (cercles pleins), les clones YAC chevauchants couvrant le chromosome. Seule une petite partie de la carte est reproduite (D'après I. Chumakov *et al.*, 1992. *Nature* **359** :380).

admettant qu'environ 3 % seulement du génome correspond à des séquences codantes, cette tâche est évidemment plus légère que celle de séquencer tout le génome. Pour séquencer les régions codant les protéines, on a séquencé au hasard de petits tronçons d'ADNc (200 à 300 pb) ; ces petites séquences d'ADNc sont des **étiquettes de séquence exprimée (EST)** et servent éventuellement de marqueurs pour des séquences d'ARNm. On possède à présent plus de 5 x 10^7 pb de séquences EST, ce qui représente une fraction notable de la totalité des séquences présomptives des ADNc humains. La fréquence à laquelle on tombe sur des séquences EST au cours des séquençages confirme la prévision générale de 100 000 gènes dans le génome humain. La ressource que constitue la banque de données reprenant les EST disponibles a déjà fait ses preuves, par exemple en permettant l'identification rapide d'un nouveau gène par sa parenté avec un gène cloné connu. Une future étape majeure consistera à positionner les EST sur la carte génomique. Le détail des positions occupées par les séquences transcrites dans le génome contribuera fortement au clonage positionnel de nouveaux gènes intéressants, entre autres ceux impliqués en pathologie humaine.

Séquençage d'ADN à grande échelle

Pour séquencer un fragment d'ADN humain, on peut partir d'une carte d'ADN cloné du génome, mais le séquençage de la totalité des 3 x 10^9 paires de bases est une lourde tâche. C'est pourquoi un but majeur du Pro-

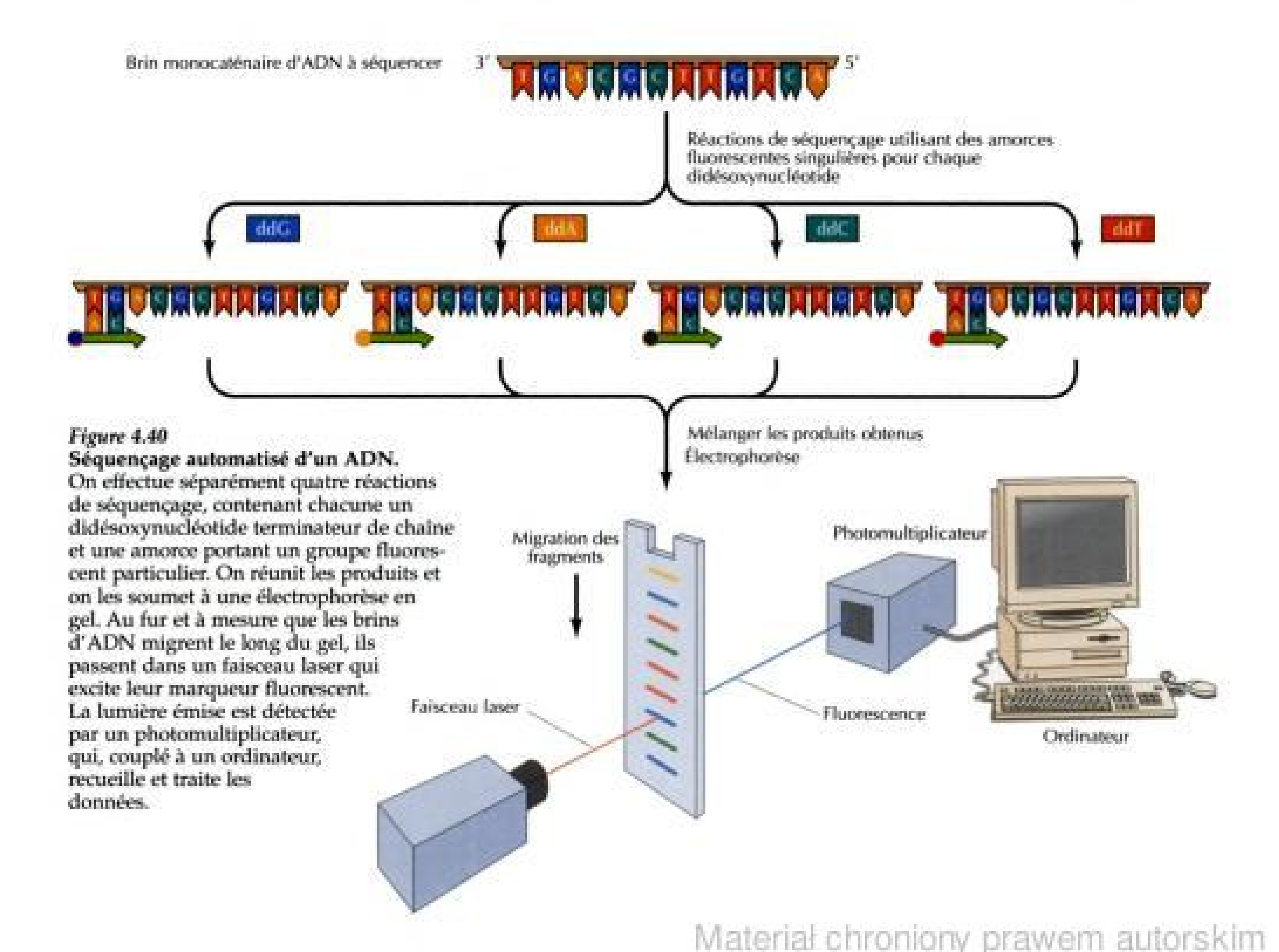


Figure 4.40
Séquençage automatisé d'un ADN. On effectue séparément quatre réactions de séquençage, contenant chacune un didésoxynucléotide terminateur de chaîne et une amorce portant un groupe fluorescent particulier. On réunit les produits et on les soumet à une électrophorèse en gel. Au fur et à mesure que les brins d'ADN migrent le long du gel, ils passent dans un faisceau laser qui excite leur marqueur fluorescent. La lumière émise est détectée par un photomultiplicateur, qui, couplé à un ordinateur, recueille et traite les données.

jet du Génome Humain fut d'améliorer les méthodes de séquençage d'ADN, de façon à venir à bout de tout le génome dans un laps de temps et avec un budget raisonnables.

Si on a d'abord cru que cette tâche exigerait d'attendre la mise au point de nouvelles technologies, le problème semble à présent résolu par l'amélioration continue des systèmes récents de séquençage d'ADN automatisé (figure 4.40). Le nœud de la stratégie est d'utiliser des amorces marquées par fluorescence dans la méthode des didésoxynucléotides (voir figure 3.25) : à mesure que les nouveaux brins, fluorescents, d'ADN défilent dans le gel d'électrophorèse, ils passent devant un rayon laser qui excite le groupe fluorescent ; la lumière émise est alors décelée par un photomultiplicateur et il reste à l'ordinateur à enregistrer les données et à les traiter.

Ce type de séquençage d'ADN automatisé a déjà servi à divers projets de séquençage de divers génomes, bactériens, de levure et de *C. elegans*. L'expérience acquise dans ces cas a apporté des améliorations à la méthodologie du séquençage et il semble possible de pouvoir séquencer le génome humain entier en moins de 10 ans. Comme le Projet du Génome Humain est en route, attendons-nous à voir publier une nouvelle base de données livrant la séquence complète de l'ADN humain, une information qui aura une portée considérable sur la recherche future en biologie et en médecine humaines.

Résumé

COMPLEXITÉ DES GÉNOMES D'EUCARYOTES

Introns et exons : La plupart des gènes d'eucaryotes ont une structure morcelée dans laquelle des tronçons de séquences codantes (exons) sont séparés par des séquences non codantes (introns). Chez les eucaryotes supérieurs, les introns occupent dix fois plus d'ADN que les exons.

Familles de gènes et pseudogènes : Maints gènes d'eucaryotes se trouvent en plusieurs exemplaires, formant une famille de gènes. Certains membres de ces familles ne fonctionnent que dans certains tissus ou à certains stades du développement embryonnaire ; d'autres membres (les pseudogènes) ont été inactivés par mutation et ne sont plus capables d'exercer une activité.

Séquences d'ADN répétitives : Près de 40 % de l'ADN de mammifère consiste en séquences d'ADN répétitives, certaines en 10^5 à 10^6 exemplaires par génome.

Nombre de gènes dans la cellule eucaryotique : Seule une fraction minime du génome des eucaryotes supérieurs correspond à des séquences codant des protéines : on estime que le génome humain comporte environ 100 000 gènes.

CHROMOSOMES ET CHROMATINE

Chromatine : L'ADN des cellules d'eucaryote s'enroule autour des histones pour former les nucléosomes. La chromatine est rendue plus compacte encore par le rassemblement des nucléosomes en structures d'ordre supérieur, comme celles des chromosomes métaphasiques très condensés des cellules en mitose.

Centromères : Ce sont des régions spécialisées des chromosomes eucaryotiques qui servent à accoler les chromatides sœurs et à ancrer ces dernières aux fibres du fuseau pendant la mitose.

TERMES CLÉ

gène, séquence intercalaire, exon, intron, excision-épissage de l'ARN, kilobase (kb)

famille de gènes, pseudogène

ADN de séquence simple, ADN satellite, SINE, LINE, séquences *Alu*

chromatine, histone, nucléosome, cœur de la particule nucléosomique, chromatosome, euchromatine, hétérochromatine

centromère, kinétochore

télomère

Télomères : Ce sont des séquences particulières nécessaires au maintien de l'intégrité des bouts des chromosomes d'eucaryotes.

CARTOGRAPHIE ET SÉQUENÇAGE DE GÉNOMES ENTIERS

mégabase (Mb), cadre de lecture ouvert

Génomes de procaryotes : On a séquencé complètement les génomes de *Haemophilus influenzae* et de *Mycoplasma genitalium*. La plus grande part de ces génomes bactériens consiste en séquences codant des protéines.

électrophorèse en gel sous champ pulsé (PFGE)

Séquençage du génome de la levure : On a établi la carte des chromosomes de levure en les soumettant à une électrophorèse en champ pulsé, qui sépare les grandes molécules d'ADN. Le séquençage du génome montre que *S. cerevisiae* comporte environ 6 000 gènes, dont seulement la moitié sont apparentés à des gènes de fonction connue.

chromosome artificiel de levure (YAC)

Génome de **Caenorhabditis elegans** : Pour cartographier le génome de *C. elegans*, on s'est servi de vecteurs type chromosome artificiel de levure (YAC). Le séquençage montre que *C. elegans* contient environ 13 000 gènes, dont près de la moitié n'ont pas encore été identifiés.

chromosome polytène

Génome de la drosophile : La cartographie du génome de la drosophile est soutenue par l'analyse génétique et l'hybridation *in situ* des gènes clonés aux chromosomes polytènes.

GÉNOME DE L'HOMME

hybridation de cellules somatiques, hybridation *in situ* en fluorescence (FISH), polymorphisme de longueur des fragments de restriction (PLFR), microsatellite, clonage par positionnement, thérapie génique

Cartographie des gènes humains : Pour établir la carte des gènes humains, on utilise des cellules somatiques hybrides, l'hybridation des ADN *in situ* et l'analyse des liaisons génétiques. La position de certains gènes humains pathologiques sur la carte a permis de les isoler par clonage positionnel.

site à séquence étiquetée (STS), marqueur à séquence exprimée (EST)

Cartographie physique du génome humain : Cette carte a été construite à partir de clones YAC. Le séquençage au hasard de clones d'ADNc a fourni des marqueurs pour reconnaître certaines séquences portées par les ARNm.

Séquençage d'ADN à grande échelle : On espère que le séquençage automatisé d'ADN nous livrera la séquence de tout le génome humain dans les 5 ou 10 années à venir.

QUESTIONNAIRE

1. On a découvert les séquences d'ADN répétitives en mesurant la vitesse de réassociation de diverses molécules d'ADN dénaturées. Quelle serait la vitesse de réassociation de séquences d'ADN répétées 1 000 fois dans le génome en comparaison de celle de séquences dont il n'existe qu'un exemplaire dans le génome ?

2. Quel est le nombre de molécules d'histones associées aux chromosomes d'une cellule humaine ? En supposant que la cellule type contient à peu près 1 ng de protéine, quelle proportion de la quantité totale de protéine les histones représentent-elles ?

3. En se basant sur le nombre de gènes de *C. elegans* à présent recensés, quelle est la fraction de l'ADN de *C. elegans* qui correspond à des séquences codant les protéines ?

4. Pour quelles raison les vecteurs YAC sont-ils utiles dans l'étude des génomes complexes ? Quel rôle jouent les télomères dans ces vecteurs ?

5. Vous tentez de cloner le gène humain responsable d'une maladie et avez trouvé sa position sur la carte de liaison actuelle du génome humain. Quelle est la quantité d'ADN que vous devrez cloner pour isoler votre gène ? De combien de clones de cosmides avez-vous besoin pour couvrir cette région ?

POUR EN SAVOIR PLUS

Références générales

Hartl, D. L. 1994. *Genetics*. 3rd ed. Boston: Jones and Bartlett.

Singer, M. and P. Berg. 1991. *Genes and Genomes*. Mill Valley, CA: University Science Books.

Watson, J. D., M. Gilman, J. Witkowski and M. Zoller. 1992. *Recombinant DNA*. 2nd ed. New York: Scientific American Books.

Complexité des génomes d'eucaryotes

Andersson, S. G. E. *et al*. 1998. The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of the mitochondria. *Nature* **396**:133-140.[O]

Bancroft, I. *et al*. (1998) Analysis of the 1.9-Mb of continuous sequence from chromosome 4 of *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **391**:485-492.[O]

Berget, S. M., C. Moore and P. A. Sharp. 1977. Spliced segments at the 5'terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 3171–3175. [P]

Breathnach, R., J. L. Mandel and P. Chambon. 1977. Ovalbumin gene is split in chicken DNA. *Nature* 270: 314–319. [P]

Britten, R. J. and D. E. Kohne. 1968. Repeated sequences in DNA. *Science* 161: 529–540. [P]

Charlesworth, B., P. Sniegowski and W. Stephan. 1994. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature* 371: 215–220. [R]

Chow, L. T., R. E. Gelinas, T. R. Broker and R. J. Roberts. 1977. An amazing sequence arrangement at the 5'ends of adenovirus 2 messenger RNA. *Cell* 12: 1–8. [P]

Cole, S. T. *et al*. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **393**:537-544.[O]

Decker, G. *et al*. (1998) The complete genome of the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*. *Nature* **392**:353. Commentaire et liste des génomes déchiffrés: ibid. 339.[O]

Fraser, Cl. M. 1997. The complete genome sequence of a Lyme disease spirochaete *Borrelia burgdorferi*. *Nature* **390**:580. [O]

Fritsch, E. F., R. M. Lawn and T. Maniatis. 1980. Molecular cloning and characterization of the human b-like globin gene cluster. *Cell* 19: 959–972. [P]

Gilbert, W. 1985. Genes-in-pieces revisited. *Science* 228: 823–824. [R]

Hentschel, C. C. and M. L. Birnsteil. 1981. The organization and expression of histone gene families. *Cell* 25: 301–313. [R]

Kaneko, T. *et al*. 1996. Sequence analysis of the entire genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. *DNA Res*. 3:103-136.[O]

Klenk, H.-P. *et al*. 1997. The complete genome sequence of the hyperthermophilic archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Nature* **390**:364-370.[O]

Kunst, F. *et al*. (1997) The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390**:249-258.[O]

Little, P. F. R. 1982. Globin pseudogenes. *Cell* 28: 683–684. [R]

Schmid, C. W. and W. R. Jelinek. 1982. The *Alu* family of dispersed repetitive sequences. *Science* 216: 1065–1070. [R]

Singer, M. F. 1982. SINEs and LINEs: Highly repeated short and long interspersed sequences in mammalian genomes. *Cell* 28: 433–434. [R]

Singer, M. F. and J. Skowronski. 1985. Making sense out of LINEs: Long interspersed repeat sequences in mammalian genomes. *Trends Biochem. Sci*. 10: 119–122. [R]

Stoltzfus, A., D. F. Spencer, M. Zuker, J. M. Logsdon, Jr. and W. F. Doolittle. 1994. Testing the exon theory of genes: The evidence from protein structure. *Science* 265: 202–207. [R]

The Yeast genome. 1997. *Nature* **387**:1-105.[O]

Tilghman, S. M., P. J. Curtis, D. C. Tiemeier, P. Leder and C. Weissmann. 1978. The intervening sequence of a mouse b-globin gene is transcribed within the 15S b-globin mRNA precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 1309–1313. [P]

Chromosomes et chromatine

Blackburn, E. H. 1991. Structure and function of telomeres. *Nature* 350: 569–573. [R]

Blackburn, E. H. 1994. Telomeres: No end in sight. *Cell* 77: 621–623. [R]

Bloom, K. 1993. The centromere frontier: Kinetochore components, microtubule-based motility and the CEN-value paradox. *Cell* 73: 621–624. [R]

Carbon, J. 1984. Yeast centromeres: Structure and function. *Cell* 37: 351–353. [R]

Clarke, L. 1990. Centromeres of budding and fission yeasts. *Trends Genet*. 6: 150–154. [R]

Clarke, L. and J. Carbon. 1980. Isolation of a yeast centromere and construction of functional small circular chromosomes. *Nature* 287: 504–509. [P]

Comings, D. E. 1978. Mechanisms of chromosome banding and implications for chromosome structure. *Ann. Rev. Genet*. 12: 25–46. [R]

de Lange, T. (1998) Ending up with the right partner. (Rôle des télomères dans la recombinaison méiotique) *Nature* **392**:825 et 829.[O]

Felsenfeld, G. 1992. Chromatin as an essential part of the transcriptional mechanism. *Nature* 355: 219–224. [R]

Greider, C. & Blackburn, E. 1996. Télomères, télomérase et cancer. *Pour la Science* avril 1996:72.

Grunstein, M. 1992. Histones as regulators of genes. *Sci. Am*. 267(4): 68–74B. [R]

Haaf, T., P. E. Warburton and H. F. Willard. 1992. Integration of human a-satellite DNA into simian chromosomes: Centromere protein binding and disruption of normal chromosome segregation. *Cell* 70: 681–696. [P]

Han-Wong L. *et al*. (1998) Essential role of mouse telomerase in highly proliferative organs. *Nature* **392**:569-574.[O]

Kornberg, R. D. 1974. Chromatin structure: A repeating unit of histones and DNA. *Science* 184: 868–871. [P]

Kornberg, R. D. and Y. Lorch. 1992. Chromatin structure and transcription. *Ann. Rev. Cell Biol*. 8: 563–587. [R]

Luger, K. *et al*. 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 angström resolution. *Nature* **389**:251.[O]

Pardue, M. L. and J. G. Gall. 1970. Chromosomal localization of mouse satellite DNA. *Science* 168: 1356–1358. [P]

Paulson, J. R. and U. K. Laemmli. 1977. The structure of histone-depleted metaphase chromosomes. *Cell* 12: 817–828. [P]

Pluta, A. F., A. M. MacKay, A. M. Ainsztein, A. G. Goldberg and W. C. Earnshaw. 1995. The centromere: Hub of chromosomal activities. *Science* 270: 1591–1594. [R]

Richmond, T. J., J. T. Finch, B. Rushton, D. Rhodes and A. Klug. 1984. Structure of the nucleosome core particle at 7 Å resolution. *Nature* 311: 532–537. [R]

Saitoh, H., J. Tomkiel, C. A. Cooke, H. Ratrie III, M. Maurer, N. F. Rothfield and W. C. Earnshaw. 1992. CENP-C, an autoantigen in scleroderma, is a component of the human inner kinetochore plate. *Cell* 70: 115–125. [P]

Saitoh, Y. and U. K. Laemmli. 1994. Metaphase chromosome structure: Bands arise from a differential folding path of the highly AT-rich scaffold. *Cell* 76: 609–622. [P]

Schulman, I. and K. S. Bloom. 1991. Centromeres: An integrated protein/DNA complex required for chromosome movement. *Ann. Rev. Cell Biol*. 7: 311–336. [R]

Szostak, J. W. and E. H. Blackburn. 1982. Cloning yeast telomeres on linear plasmid vectors. *Cell* 29: 245–255. [P]

Van Holde, K. E. 1989. *Chromatin*. New York: Springer-Verlag.

Van Holde, K. E. and J. Zlatanovai. 1995. Chromatin higher order structure: Chasing a mirage. *J. Biol. Chem.* 270: 8373–8376. [R]

Willard, H. F. 1990. Centromeres of mammalian chromosomes. *Trends Genet.* 6: 410–416. [R]

Wolffe, A. 1995. *Chromatin: Structure and Function*. 2nd ed. New York: Academic Press.

Zakian, V. A. 1995 Telomeres: Beginning to understand the end. *Science* 270: 1601–1607. [R]

Cartes et séquence de génomes entiers

Burke, D. T., G. F. Carle and M. V. Olson. 1987. Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors. *Science* 236: 806–812. [P]

Coulson, A., R. Waterston, J. Kiff, J. Sulston and Y. Kohara. 1988. Genome linking with yeast artificial chromosomes. *Nature* 335: 184–186. [P]

Daniels, D. L., G. Plunkett III, V. Burland and F. R. Blattner. 1992. Analysis of the *Escherichia coli* genome: DNA sequence of the region from 84.5 to 86.5 minutes. *Science* 257: 771–778. [P]

Dujon, B. and 107 others. 1994. Complete DNA sequence of yeast chromosome XI. *Nature* 369: 371–378. [P]

Fleischmann, R. D. and 39 others. 1995. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* 269: 496–512. [P]

Fraser, C. M. and 28 others. 1995. The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science* 270: 397–403. [P]

Garza, D., J. W. Ajioka, D. T. Burke and D. L. Hartl. 1989. Mapping the *Drosophila* genome with yeast artificial chromosomes. *Science* 246: 641–646. [R]

Hodgkin, J., R. H. A. Plasterk and R. H. Waterston. 1995. The nematode *Caenorhabditis elegans* and its genome. *Science* 270: 410–414. [R]

Johnston, M. and 34 others. 1994. Complete nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome VIII. *Science* 265: 2077–2082. [P]

Merriam, J., M. Ashburner, D. L. Hartl and F. C. Kafatos. 1991. Toward cloning and mapping the genome of *Drosophila*. *Science* 254: 221–225. [R]

Oliver, S. G. and 146 others. 1992. The complete DNA sequence of yeast chromosome III. *Nature* 357: 38–46. [P]

Olson, M. V. 1991. Genome structure and organization in *Saccharomyces cerevisiae*. In *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast* Saccharomyces: *Genome Dynamics, Protein Synthesis, and Energetics* ed. J. R. Broach, J. R. Pringle and E. W. Jones, 1–39. Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Génome humain

Adams, M. D. and 12 others. 1991. Complementary DNA sequencing: Expressed sequence tags and human genome project. *Science* 252: 1651–1656. [R]

Adams, M. D. and 85 others. 1995. Initial assessment of human gene diversity and expression patterns based upon 83 million nucleotides of cDNA sequence. *Nature* 377 Suppl.: 3–174. [P]

Boguski, M. S. 1995. The turning point in genome research. *Trends Biochem. Sci.* 20: 295–296. [R]

Botstein, D., R. L. White, M. Skolnick and R. W. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *Am. J. Hum. Genet.* 32: 314–331. [P]

Capecchi, M. 1994. Le remplacement de gènes. *Pour la Science* 199:56.

Chumakov, I. and 35 others. 1992. Continuum of overlapping clones spanning the entire human chromosome 21q. *Nature* 359: 380–387. [P]

Chumakov, I. M. and 62 others. 1995. A YAC contig map of the human genome. *Nature* 377 Suppl.: 175–298. [P]

Cohen, D., I. Chumakov and J. Weissenbach. 1993. A first-generation physical map of the human genome. *Nature* 366: 698–701. [P]

Collins, F. S. 1992. Cystic fibrosis: Molecular biology and therapeutic implications. *Science* 256: 774–779. [R]

Cooperative Human Linkage Center. 1994. A comprehensive human linkage map with centimorgan density. *Science* 265: 2049–2054. [P]

Crystal, R. G. 1995. Transfer of genes to humans: Early lessons and obstacles to success. *Science* 270: 404–410. [R]

Dib, C. and 13 others. 1996. A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature* 380: 152–154. [P]

Donis-Keller, H. and 32 others. 1987. A genetic linkage map of the human genome. *Cell* 51: 319–337. [P]

Erickson, D. 1992. Le déchiffrage du génome humain. *Pour la Science* n°176:80-87.[R]

Felgner, Ph. 1997. La thérapie génique sans virus. *Pour la Science* n°241:66-70.[R]

Foote, S., D. Vollrath, A. Hilton and D. C. Page. 1992. The human Y chromosome: Overlapping DNA clones spanning the euchromatic region. *Science* 258: 60–66. [P]

Friedman, Th. 1997. Thérapie génique : promesses et limites. *Pour la Science* n° 241:60-65.[R]

Hudson, T. J. and 50 others. 1995. An STS-based map of the human genome. *Science* 270: 1945–1954. [P]

Hunkapiller, T., R. J. Kaiser, B. F. Koop and L. Hood. 1991. Large-scale and automated DNA sequence determination. *Science* 254: 59–67. [R]

McKusick, V. A. 1995. *Mendelian Inheritance in Man*. 11th ed. Baltimore: Johns Hopkins University Press.

Nakamura, Y., M. Leppert, P. O'Connell, R. Wolff, T. Holm, M. Culver, C. Martin, E. Fujimoto, M. Hoff, E. Kumlin and R. White. 1987. Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science* 235: 1616–1622. [P]

Olson, M. V. 1995. A time to sequence. *Science* 270: 394–396. [R]

Olson, M., L. Hood, C. Cantor and D. Botstein. 1989. A common language for physical mapping of the human genome. *Science* 245: 1434–1435. [R]

Perricaudet, M. *et al.* 1992. La thérapie génique par adénovirus. *La Recherche* n°242:471.

Rommens and 14 others. 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: Chromosome walking and jumping. *Science* 245: 1059–1065. [P]

Ruddle, F. H. 1981. A new era in mammalian gene mapping: Somatic cell genetics and recombinant DNA methodologies. *Nature* 294: 115–120. [R]

Weiss, M. C. and H. Green. 1967. Human-mouse hybrid cell lines containing partial complements of human chromosomes and functioning human genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 58: 1104–1111. [P]

5

Réplication, surveillance et réarrangement de l'ADN génomique

Le nœud du processus biologique de reproduction réside dans le fait que l'information retenue chez les géniteurs se transmet fidèlement aux descendants ; la réplication minutieuse de l'ADN génomique est donc essentielle pour la vie des cellules et des organismes. Chaque fois qu'une cellule se divise, son génome doit se répliquer entièrement, grâce à une machinerie complexe qui copie les immenses molécules d'ADN qui constituent les chromosomes des procaryotes et des eucaryotes. En outre, les cellules ont trouvé le moyen de corriger les erreurs introduites parfois au cours de la réplication de l'ADN, ainsi que de réparer les lésions de l'ADN dues à l'action d'agents extérieurs comme les radiations. Si ces processus ne fonctionnent pas normalement, l'ADN génomique ne se réplique pas correctement et ne se transmet pas fidèlement — une situation grevée de menaces sérieuses, par exemple l'apparition d'un cancer.

Le fait crucial que l'ADN se réplique et se perpétue avec une haute fidélité n'empêche pas cependant le génome cellulaire d'être malléable. Pour que les espèces évoluent, il faut que des mutations et des réarrangements de gènes produisent des variations génétiques d'individus à individus. Une recombinaison entre chromosomes homologues au cours de la méiose jouera un rôle majeur dans ce processus, car elle fait que des gènes parentaux se redistribuent en formant de nouvelles combinaisons chez les descendants directs. On pense que tout réarrangement de séquences d'ADN génomique contribue à l'évolution des espèces en créant des combinaisons inédites d'information génétique. D'ailleurs, certains réarrangements sont programmés pour ajuster l'expression des gènes durant la différenciation des cellules et le développement embryonnaire de tout organisme. Chez l'Homme, un exemple frappant est le réarrangement des gènes d'anticorps lors de la maturation du système immunitaire. Un équilibre subtil entre immuabilité et variabilité de l'information génétique est donc crucial pour le développement embryonnaire de chaque organisme et pour l'évolution des espèces.

RÉPLICATION DE L'ADN

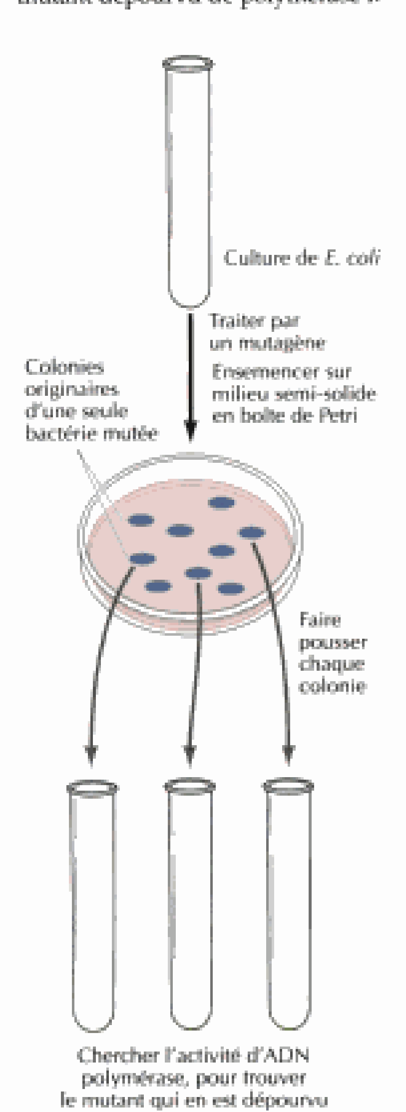
Comme nous l'avons indiqué au chapitre 3, la réplication de l'ADN est un processus semi-conservatoire dans lequel chaque brin d'ADN parental sert de matrice pour la synthèse d'un nouveau brin fils complémentaire. L'enzyme clé est ici l'ADN polymérase, qui catalyse l'enchaînement des triphosphates désoxynucléotidiques (dNTP) en une chaîne naissante d'ADN.

La réplication d'un ADN n'est cependant pas équivalente à une simple réaction enzymatique, car d'autres protéines entrent en jeu, ainsi qu'un processus de correction sur épreuves, qui rend la réplication tellement parfaite que la fréquence d'erreurs est assez faible pour ne pas menacer la survie de la lignée cellulaire. D'autres protéines et des séquences d'ADN particulières sont également requises pour amorcer la réplication et répliquer les bouts des chromosomes eucaryotiques.

ADN polymérases

L'**ADN polymérase** fut découverte dans les lysats de cellules *E. coli* par Arthur Kornberg en 1956. Comme le pouvoir qu'a l'ADN polymérase de copier une matrice d'ADN de façon impeccable donnait une base biologique au mode de reproduction de l'ADN imaginé par Watson et Crick, l'isolement de cet enzyme fut une découverte maîtresse de la biologie moléculaire. Qu'on ne s'étonne pas cependant si la première ADN polymérase identifiée (baptisée à présent ADN polymérase I) n'est pas l'enzyme qui réplique la majeure partie de l'ADN de *E. coli* : on a découvert que les cellules de procaryotes et d'eucaryotes possèdent plusieurs espèces d'ADN polymérases, qui jouent chacune un rôle distinct dans la réplication et la réparation de l'ADN.

Figure 5.1
Isolement d'un mutant déficient en polymérase I. On a traité une culture de *E. coli* par un mutagène chimique, puis on a isolé à l'état pur de nombreuses colonies bactériennes sur milieu semi-solide. On a mis plusieurs milliers de ces colonies en culture et on les a criblées pour identifier un mutant dépourvu de polymérase I.



C'est la découverte d'une souche mutante de *E. coli* où l'ADN polymérase I était introuvable qui a mis au jour d'autres ADN polymérases (figure 5.1). Après avoir traité des cultures de *E. coli* par une substance (un mutagène) qui induit une grande quantité de mutations, on a isolé des colonies bactériennes et on les a criblées dans le but d'identifier une souche mutante dépourvue de polymérase I. En criblant quelques milliers de colonies, on a trouvé le mutant désiré, presque totalement dépourvu d'activité de polymérase I, mais qui était cependant, à la surprise des expérimentateurs, capable de proliférer normalement ; ceux-ci devaient en conclure que la polymérase I n'était pas indispensable à la réplication d'ADN. D'autre part, ces bactéries mutantes étaient extrêmement sensibles aux agents qui endommagent l'ADN (par exemple les UV), ce qui suggérait que l'ADN polymérase I servait principalement à réparer les lésions infligées à l'ADN, plutôt qu'à répliquer ses brins.

On devait en conclure que si l'ADN polymérase I de *E. coli* ne sert pas à répliquer l'ADN, c'est que cette bactérie possède d'autres ADN polymérases ; les expériences ultérieures identifièrent deux enzymes de ce type, les ADN polymérases II et III. Leur spécificité enzymatique fut précisée grâce à l'isolement des mutants appropriés. Comme les souches de *E. coli* portant des mutations dans le gène de la polymérase II poussent et se comportent normalement, on n'est pas parvenu à définir le rôle de cet enzyme. Cependant, des mutants thermosensibles de la polymérase III étaient incapables de répliquer leur ADN à température élevée ; d'autres expériences allaient confirmer le fait que la polymérase III est le principal enzyme de réplication chez *E. coli*.

On sait à présent que non seulement la polymérase III, mais aussi la polymérase I, sont indispensables pour répliquer l'ADN de *E. coli*. Le mutant d'origine de la polymérase I n'était pas tout à fait dépourvu d'activité enzymatique et des expériences supplémentaires ont montré que l'activité résiduelle de la polymérase I de cette souche joue un rôle capital dans le processus de réplication. La réplication de l'ADN de *E. coli* fait donc intervenir deux ADN polymérases dont nous allons préciser le rôle particulier.

Les cellules eucaryotiques possèdent cinq ADN polymérases, à savoir α, β, γ, δ et ε. La polymérase γ est confinée aux mitochondries et sert à répliquer l'ADN mitochondrial. Confinés au noyau, les quatre autres enzymes doivent servir à répliquer l'ADN nucléaire. Comme les polymérases α, δ et ε sont le plus actives dans les cellules en mitose, on suppose qu'elles servent à la réplication, mais la polymérase β est active aussi bien dans les cel-

lules en mitose que dans les cellules quiescentes ; aussi pense-t-on que son rôle principal est de réparer l'ADN endommagé.

Deux sortes d'expériences ont fourni d'autres arguments pour préciser le rôle des polymérases α, δ et ε dans la réplication. On peut, d'une part, sur des extraits cellulaires, étudier la réplication de l'ADN de certains virus animaux comme SV40 ; cela a permis d'identifier directement les enzymes en cause et on a constaté que l'ADN de SV40 ne se réplique qu'en présence des polymérases α et δ. D'autre part, comme les polymérases α, δ et ε sont présentes chez les levures et dans les cellules de mammifère, on a profité d'une puissante approche expérimentale, à savoir la génétique des levures (voir chapitre 3) pour prouver directement leur rôle biologique : les mutants de levure dépourvus d'une de ces trois polymérases ne poussent plus. Cependant, comme on n'est pas parvenu à prouver biochimiquement le rôle tenu par la polymérase ε dans la réplication, on pense que cet enzyme fait plutôt partie d'une voie de réparation des ADN qui est indispensable à la survie de la cellule.

Toutes les ADN polymérases possèdent deux traits fondamentaux qui dictent les modalités particulières au mécanisme de réplication d'ADN (figure 5.2). D'une part, aucune ADN polymérase ne synthétise d'ADN autrement que dans le sens 5'→3', en ajoutant un dNTP au groupe hydroxyle 3' d'une chaîne naissante. D'autre part, les ADN polymérases n'ajoutent un nouveau nucléotide que si elle disposent d'un brin amorce préformé, lié par liaisons hydrogène à la matrice ; elles sont incapables de démarrer une synthèse *de novo* en catalysant la polymérisation de dNTP libres. Sur ce point, les ADN polymérases diffèrent des ARN polymérases qui, elles, commencent la synthèse d'un nouveau brin d'ARN en l'absence d'amorces. Comme nous allons le montrer, ces propriétés des ADN polymérases sont cruciales pour assurer à la réplication d'ADN la haute fiabilité requise par la perpétuation de la cellule.

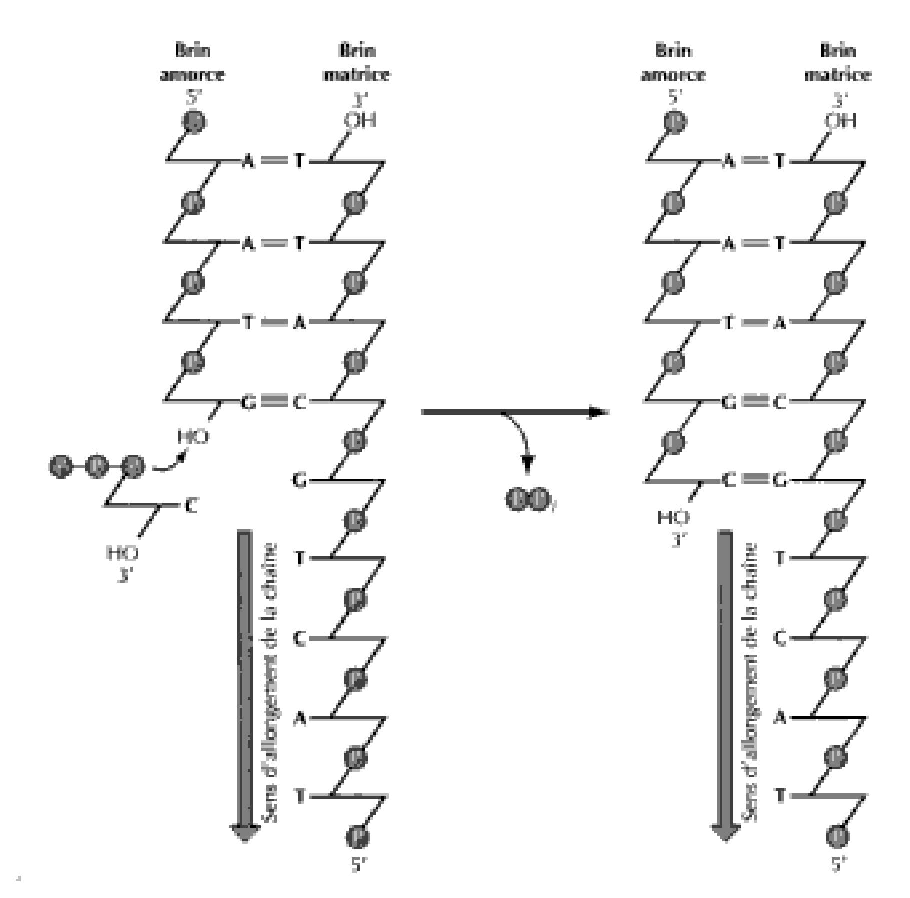


Figure 5.2
Réaction catalysée par l'ADN polymérase. Les ADN polymérases ajoutent toutes un résidu désoxyribonucléoside 5'-monophosphate au groupe hydroxyle 3' d'une chaîne d'ADN naissante (le brin amorce).

Fourche de réplication

C'est John Cairns qui, le premier, a décrit les molécules d'ADN en train de se répliquer ; en cultivant *E. coli* en présence de désoxythymidine radioactive, il distinguait par autoradiographie la présence de molécules d'ADN néoformées (figure 5.3), parfois même de molécules entières fermées sur elles-mêmes, en train de se répliquer. Celles-ci comportaient deux **fourches de réplication** correspondant aux régions de synthèse active d'ADN ; à chacune des fourches, les brins parentaux se disjoignaient et des brins fils prenaient naissance.

La synthèse de brins nouveaux d'ADN complémentaires à chacun des brins de la molécule parentale soulevait une difficulté majeure quant au processus biochimique de la réplication d'ADN. Puisque les brins de la molécule bicaténaire courent en sens opposés (ils sont antiparallèles), la synthèse continue des deux nouveaux brins à la fourche de réplication exige qu'un brin s'allonge dans le sens 5'→3' pendant que l'autre s'allonge dans le sens opposé 3'→5' ; or, on sait que l'ADN polymérase ne catalyse l'addition de dNTP que dans le sens 5'→3' : à première vue, on ne pouvait expliquer comment l'autre brin se construisait.

L'énigme fut résolue par des expériences qui révélèrent qu'un seul brin est synthétisé de façon ininterrompue, dans le sens où la molécule entière s'allonge ; l'autre brin est assemblé pas à pas à partir de petits fragments d'ADN synthétisés à rebours du sens dans lequel migre la fourche de réplication (figure 5.4). Ces petits morceaux d'ADN naissants (appelés **fragments d'Okazaki,** du nom de celui qui les a découvert) sont réunis ensuite par l'**ADN ligase** en un brin continu d'ADN nouveau. On qualifie le brin synthétisé en continu de **brin avancé**, car sa croissance, synchrone du déplacement de la fourche de réplication met à nu la matrice servant à synthétiser les fragments d'Okazaki (**brin retardé**).

Même si la découverte de ce mode discontinu de synthèse du brin retardé révélait un mécanisme justifiant la croissance des deux brins d'ADN au niveau de la fourche de réplication, il soulevait une autre énigme, à savoir de quelle manière les fragments d'Okazaki se formaient, puisque l'ADN polymérase exige une amorce et ne démarre jamais une synthèse *de novo*. On découvrit alors les petits fragments d'ARN qui servent d'amorce à la polymérase (figure 5.5) ; en effet, contrairement à la synthèse d'ADN, la synthèse d'ARN se met en route *de novo*, grâce à un enzyme appelé **primase**, qui synthétise de courts fragments d'ARN, longs de 3 à 10 nucléotides, com-

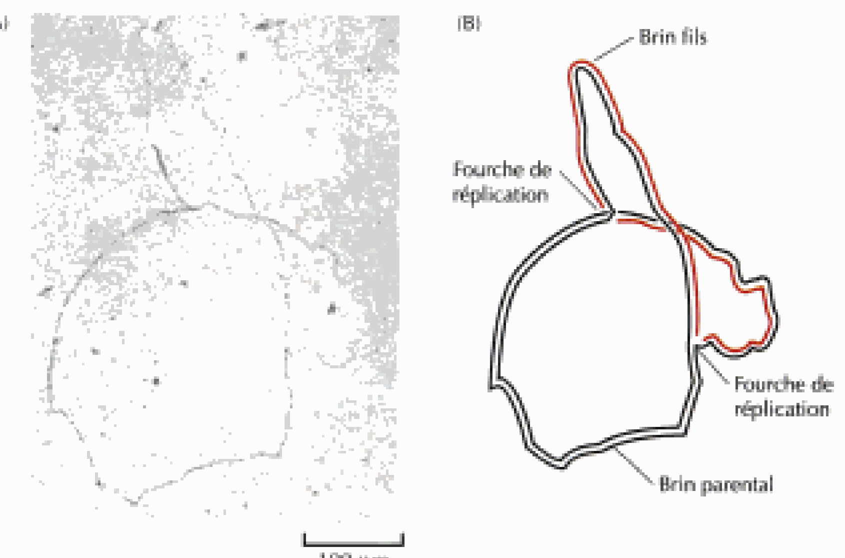


Figure 5.3
Réplication de l'ADN de *E. coli*.
(A) Autoradiographie montrant le chromosome d'une bactérie qu'on a fait pousser pendant deux générations en présence de désoxythymidine [^{3}H] pour en marquer l'ADN ; on a extrait ce dernier, on l'a étalé sur une grille, puis on y a exposé un film photographique. (B) Le calque montre les deux fourches de réplication visibles en (A). (Tiré de John Cairns, *Cold Spring Harbor Symposium Quant. Biol., 1963,* **28** :43).

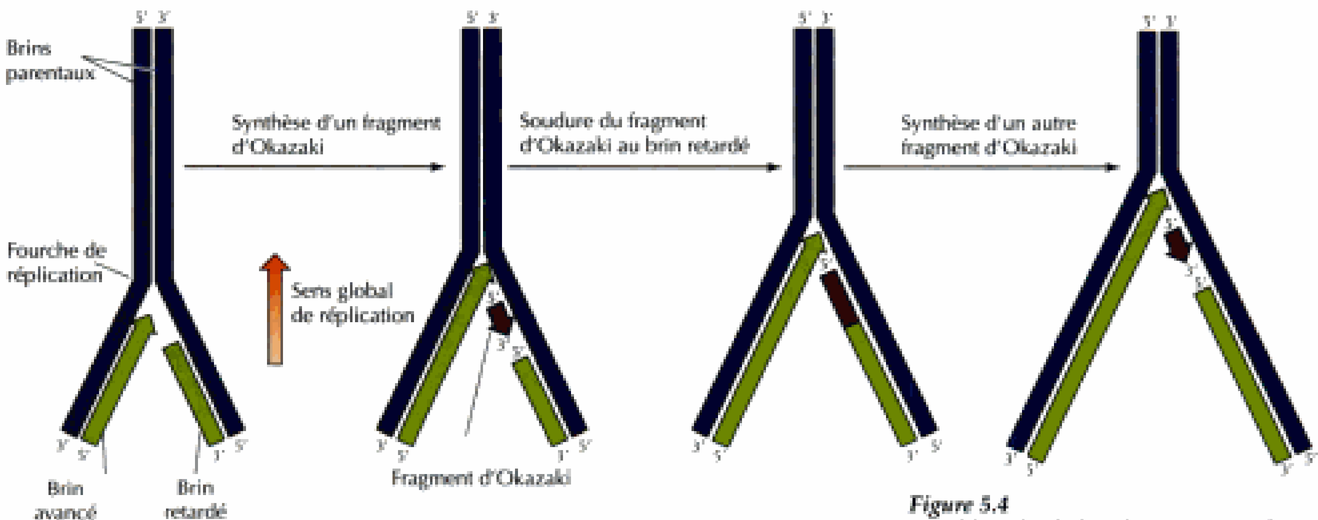
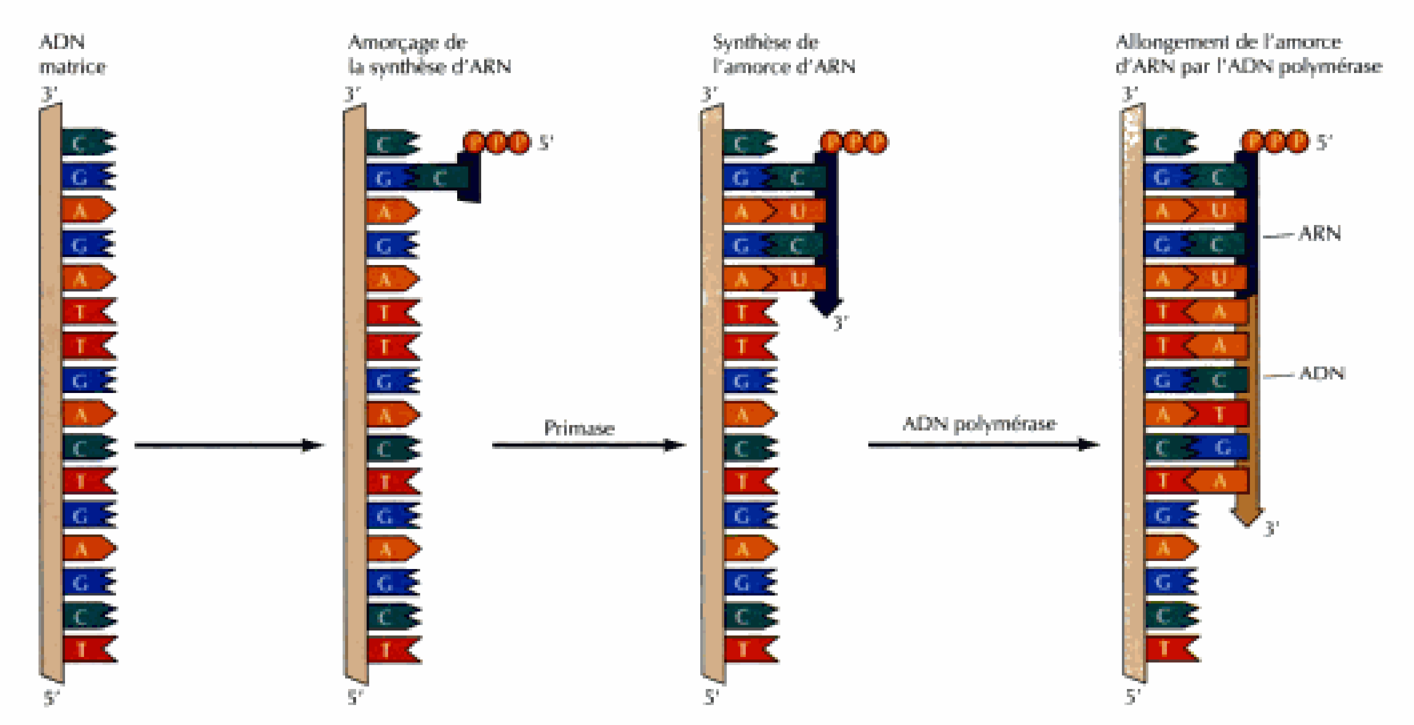


Figure 5.4
Synthèse des brins d'ADN avancé et retardé. Le brin avancé se forme de façon continue dans le sens de migration de la fourche de réplication. Le brin retardé est synthétisé morceau par morceau (les fragments d'Okazaki) à rebours par rapport au sens de migration de la fourche de réplication. Les fragments d'Okazaki sont ensuite soudés les uns aux autres par l'ADN ligase.

plémentaires de la partie du brin matrice retardé qui avoisine la fourche de réplication. Les fragments d'Okazaki se forment ensuite par allongement de ces amorces ARN sous l'action de l'ADN polymérase. Une suite importante de cet amorçage sur de l'ARN est que les fragments d'Okazaki naissants comportent une jonction ARN-ADN dont la découverte fournit une démonstration frappante du rôle que jouent les amorces d'ARN dans la réplication d'un ADN.

Pour que le brin retardé soit tout d'une pièce, il faut certes que les fragments d'Okazaki fassent place à de l'ADN. Chez *E. coli*, les amorces ARN sont éliminées par action conjointe de l'**ARNase H**, un enzyme qui hydrolyse la portion ARN des brins hybrides ARN-ADN, et de la polymérase I ; c'est le stade même de la réplication de l'ADN de *E. coli* où la polymérase I joue son rôle crucial. En effet, outre son activité de polymérase, cet enzyme

Figure 5.5
Amorçage des fragments d'Okazaki sur des amorces d'ARN. De petits fragments d'ARN servent d'amorces que l'ADN polymérase va allonger.



se comporte aussi en **exonucléase**, car il hydrolyse l'ADN (ou l'ARN) aussi bien dans le sens 3'→5' que dans le sens 5'→3'. L'activité exonucléasique 3'→5' de la polymérase I enlève le ribonucléotide de l'extrémité 5' des fragments d'Okazaki, pour les remplacer par des désoxyribonucléotides et constituer des séquences d'ADN homogènes (figure 5.6). Dans les cellules d'eucaryote, d'autres exonucléases tiennent le rôle de la polymérase I de *E. coli* pour éliminer les amorces et la polymérase δ y comble les lacunes séparant les fragments d'Okazaki ; ceux-ci sont enfin soudés les uns aux autres par l'ADN ligase, comme chez les procaryotes.

Les diverses ADN polymérases tiennent donc chacune leur rôle à la fourche de réplication (figure 5.7). Chez les procaryotes, la polymérase III est le principal acteur de la réplication puisqu'elle synthétise aussi bien le brin avancé d'ADN que les fragments d'Okazaki, dont la synthèse débute sur des amorces ARN. Ensuite, la polymérase I élimine les amorces d'ARN et comble les lacunes séparant les fragments d'Okazaki. Cependant les cellules eucaryotes ont besoin de plusieurs ADN polymérases pour effectuer une tâche que la polymérase III de *E. coli* accomplit seule. La polymérase α forme un complexe avec la primase et semble coopérer avec elle à la synthèse des courts fragments ARN-ADN servant de noyau au brin retardé. Ensuite, la polymérase δ synthétise le brin avancé ainsi que le brin retardé, en allongeant les amorces ARN-ADN préformées par la conjonction des polymérase α et primase. En outre, la polymérase δ peut tenir le rôle de la polymérase I de *E. coli*, à savoir combler les lacunes apparues entre les fragments d'Okazaki après élimination des amorces. Puisque l'ADN de SV40 se réplique *in vitro* en présence des seules polymérases α et δ, le rôle de la polymérase ε n'est pas clairement défini ; elle interviendrait dans la réplication de l'ADN cellulaire, mais on ne lui a pas trouvé d'activité catalytique bien définie.

Ce ne sont pas seulement les polymérases et la primase qui fonctionnent à la fourche de réplication, mais bien d'autres protéines encore. On les a

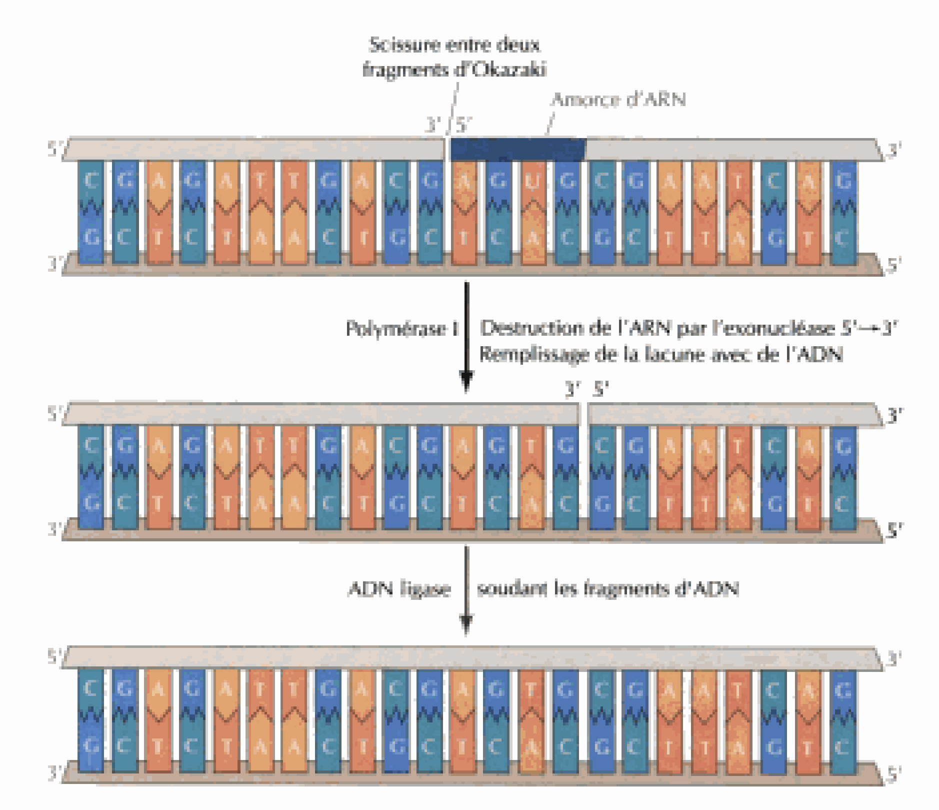


Figure 5.6
Élimination des amorces d'ARN et soudure des fragments d'Okazaki. À cause de son activité d'exonucléase 5'→3', l'ADN polymérase I élimine les amorces d'ARN et remplit d'ADN les lacunes séparant les fragments d'Okazaki. Les fragments d'ADN ainsi formés seront soudés les uns aux autres par l'ADN ligase.

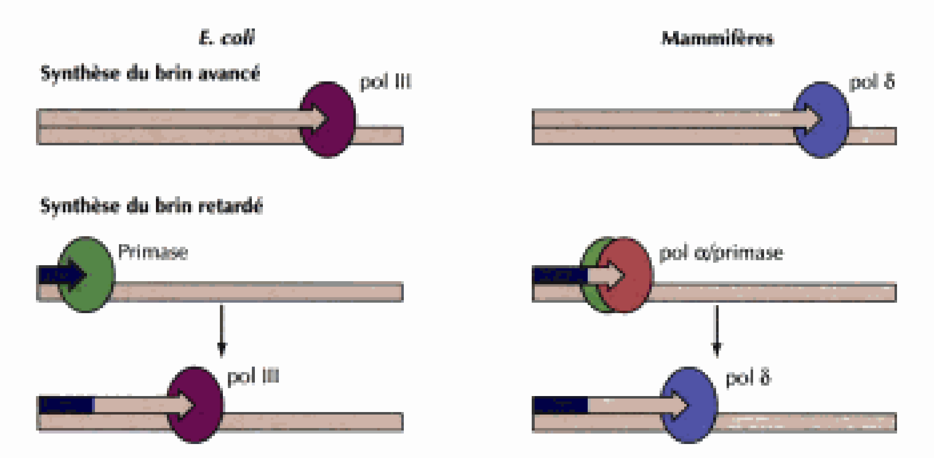


Figure 5.7
Rôle des ADN polymérases de *E. coli* et de mammifère. Le brin avancé est formé par la polymérase III chez *E. coli* et par la polymérase δ (pol δ) dans la cellule de mammifère. Chez *E. coli*, le brin retardé est amorcé par la primase et l'amorce ARN formée est allongée par la polymérase III. Dans la cellule de mammifère, la synthèse du brin avancé démarre sous l'effet d'un complexe de primase et de polymérase α (pol α). Les courts fragments ARN-ADN formés par ce complexe sont ensuite allongés par la polymérase δ.

identifiées en examinant des mutants de *E. coli* défectifs pour la réplication et en purifiant des protéines de mammifère indispensables à la réplication de SV40 *in vitro*. Une classe de ces protéines actives dans la réplication se fixe aux ADN polymérases et augmente leur activité en les retenant sur la matrice d'ADN en sorte qu'elles synthétisent le brin d'ADN naissant en continu. Aussi bien la polymérase III de *E. coli* que la polymérase I d'eucaryote sont accolées à deux sortes de protéines auxiliaires (protéine à pince coulissante et protéine tenon) qui attirent la polymérase sur l'amorce et l'empêchent de quitter la matrice (figure 5.8). Les protéines tenon (appelées complexe γ chez *E. coli* et facteur de réplication C [RFC] chez les eucaryotes) choisissent de se fixer à l'ADN entre l'amorce et la matrice. Les protéines à pince coulissante (la protéine β de *E. coli* et l'antigène nucléaire des cellules en prolifération [PCNA] des eucaryotes) se fixent au voisinage de la protéine tenon, en formant un anneau autour de la matrice d'ADN. Protéine tenon et protéine à pince coulissante arriment alors l'ADN polymérase à l'ADN, à la jonction de l'amorce avec la matrice. L'anneau formé par la pince coulissante tient la polymérase ancrée à la matrice aussi longtemps que la réplication se poursuit, en garantissant l'incorporation ininterrompue de milliers de nucléotides dans l'ADN.

D'autres protéines détordent la matrice d'ADN et stabilisent la forme monocaténaire (figure 5.9). Les **hélicases** sont des enzymes qui catalysent la détorsion de l'ADN parental, aux dépens d'ATP, en avant de la fourche de réplication. Les **protéines qui se fixent à l'ADN monocaténaire** [par exemple, le facteur eucaryotique de réplication A (RFA)] stabilisent alors la matrice d'ADN détordue sous forme monocaténaire étirée que la polymérase va répliquer rapidement.

La détorsion du brin parental force l'ADN en amont de la fourche à tourner sur lui-même ; si ce superenroulement n'est pas levé, il poussera des molécules fermées sur elles-mêmes (comme l'ADN de SV40 ou le chromosome de *E. coli*) à se mettre en vrille, ce qui finira par bloquer leur réplication (figure 5.10). Cet obstacle est levé par les **topo-isomérases**, des enzymes qui catalysent une scission temporaire suivie du rescellement des brins d'ADN. Ces enzymes sont de deux types : les topo-isomérases I ne coupent qu'un brin de l'ADN, les topo-isomérases II coupent d'un coup les deux brins. Les incisions ainsi introduites servent de pivots, permettant aux deux brins de matrice d'ADN de tourner librement l'un autour de l'autre, de façon que la réplication progresse sans rencontrer de torsion d'ADN en avant de la fourche (voir figure 5.10). Bien que les chromosomes d'eucaryotes soient des molécules linéaires (non fermées sur elles-mêmes), les topo-isomérases sont indispensables à leur réplication, sinon le chromosome entier devrait tourner sans cesse sur lui-même durant la synthèse de la chaîne d'ADN.

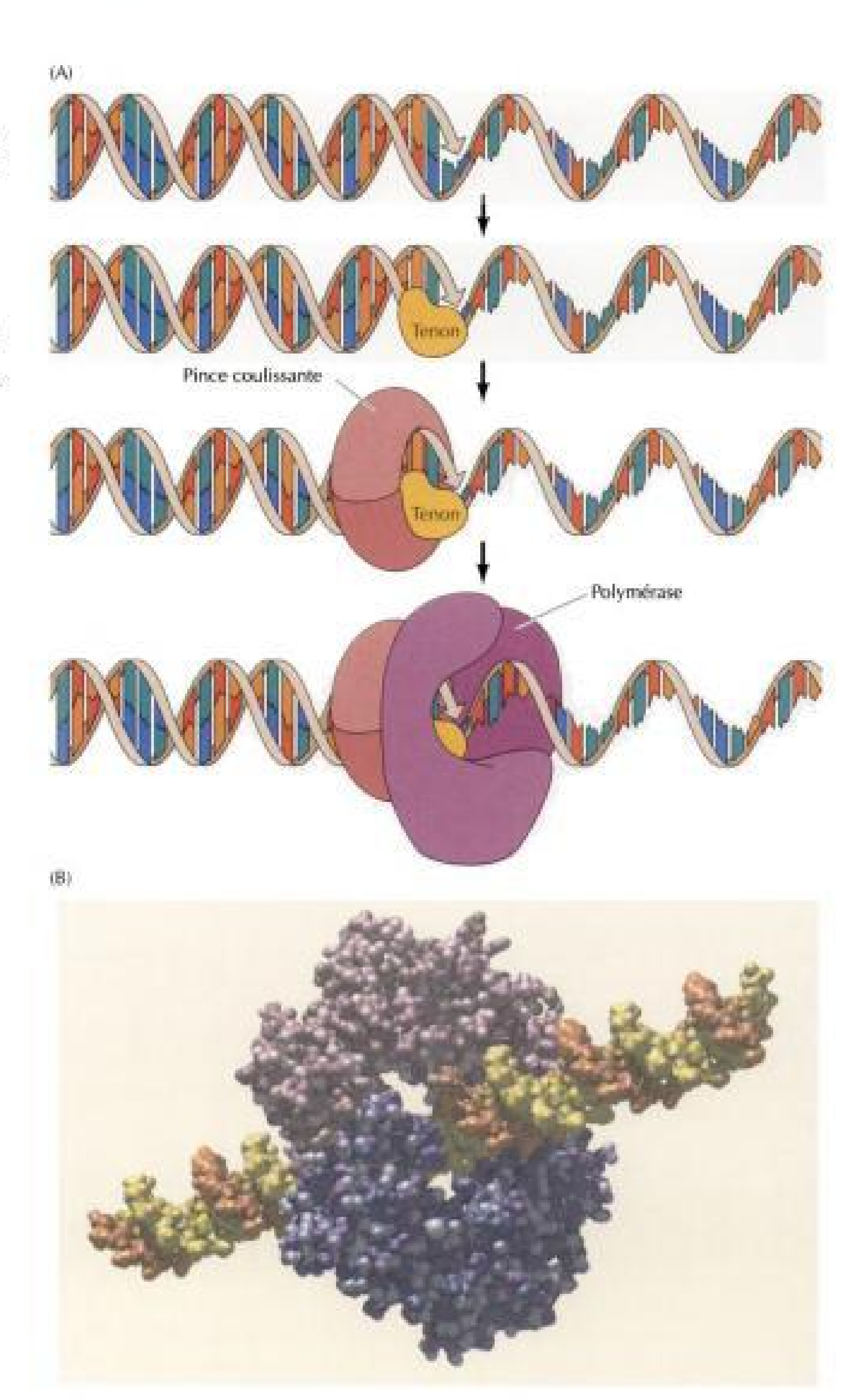


Figure 5.8
Protéines auxiliaires de la polymérase. (A) La protéine tenon (RFC chez les mammifères) s'accroche à l'ADN là où l'amorce est ancrée à la matrice. La protéine à pince coulissante (PNCA chez les mammifères) se fixe près de la protéine tenon. L'ADN polymérase vient rejoindre le complexe tenon-pince. (B) Modèle de la pince coulissante protéique fixée sur l'ADN de *E. coli*. La protéine est un dimère, dont on a coloré un protomère en bleu et l'autre en rouge ; l'ADN est en orange et jaune. (Modèle élaboré sur ordinateur par Dan Richardson)

Les topo-isomérases de type II sont requises non seulement pour détordre la molécule d'ADN, mais aussi pour libérer les nouvelles molécules fermées sur elles-mêmes qui se trouvent enchaînées les unes aux autres. En outre, la topo-isomérase II est une pièce maîtresse de l'échafaudage protéique du chromosome eucaryotique, auquel sont ancrées de grandes boucles d'ADN (voir chapitre 4). Les recherches sur les mutants de levure montrent qu'en l'absence de topo-isomérase II les chromatides sœurs refusent de se séparer

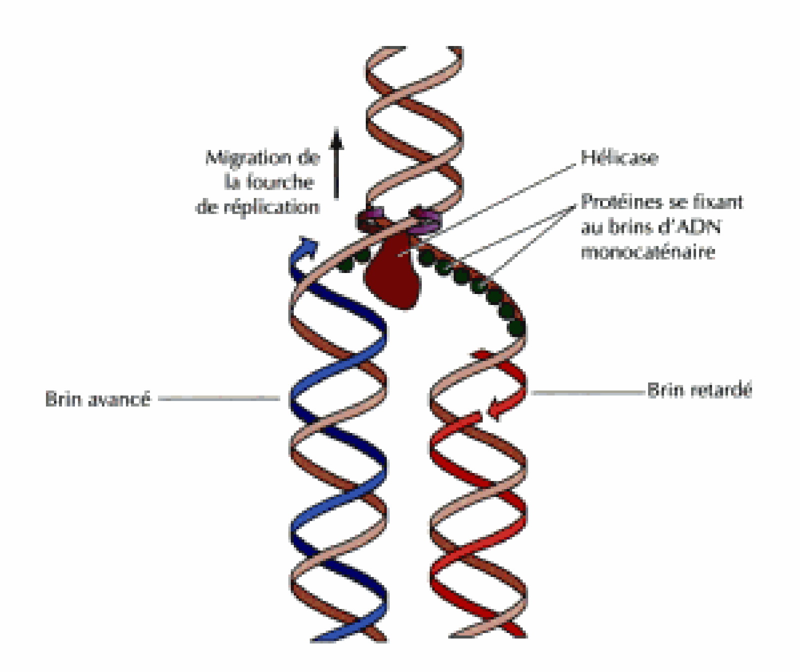


Figure 5.9
Action de l'hélicase et des protéines se fixant à l'ADN monocaténaire. Une hélicase détord les deux brins d'ADN parental en avant de la fourche de réplication. Une fois ces brins détordus, ils sont stabilisés dans cet état par des protéines liées aux brins monocaténaires d'ADN, en sorte que ceux-ci servent de matrice à une nouvelle synthèse d'ADN.

lors de la mitose, suggérant que cet enzyme dénoue aussi les enchaînements de boucles d'ADN néoformées dans le chromosome d'eucaryote.

Les enzymes en jeu dans la réplication de l'ADN agissent de manière coordonnée pour synthétiser simultanément les brins d'ADN avancé et retardé au niveau de la fourche de réplication (figure 5.11) ; pour ce faire, les ADN polymérases engagées dans la réplication (polymérase III chez *E. coli* et polymérase δ chez les eucaryotes) doivent s'associer en dimère, chacune flanquée des protéines auxiliaires appropriées. Une des molécules de polymérase du dimère synthétise le brin avancé pendant que l'autre allonge le brin retardé. Il semble que la matrice du brin retardé fasse une boucle sur elle-même à hauteur de la fourche de réplication de façon que la molécule de polymérase engagée dans la synthèse du brin retardé glisse dans le même sens que celui pris par l'autre molécule, celle qui allonge le brin avancé.

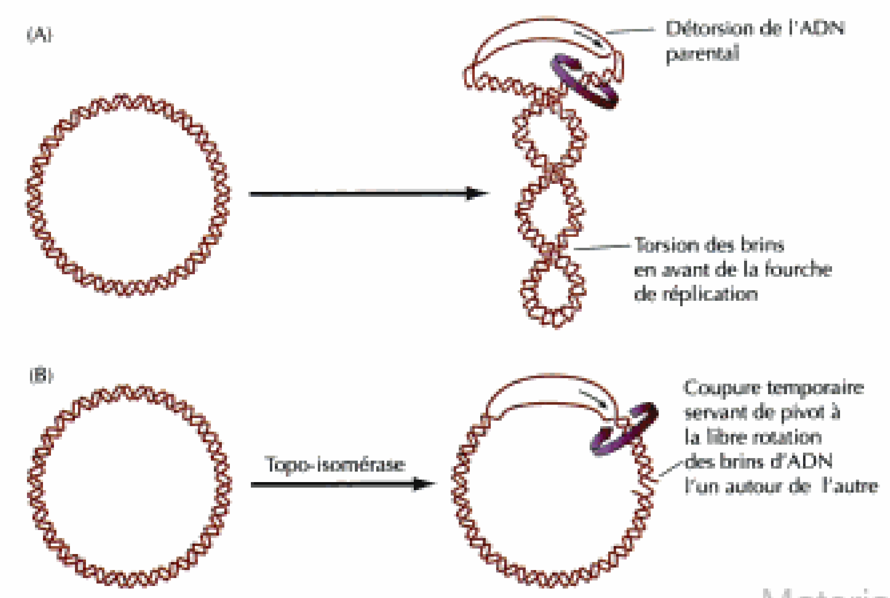


Figure 5.10
Action des topo-isomérases pendant la réplication d'ADN. (A) Au fur et à mesure que les brins matrice d'ADN se détordent, l'ADN situé en avant de la fourche de réplication doit pivoter sur lui-même dans l'autre sens, en obligeant les molécules fermées sur elles-mêmes à se mettre en vrille. (B) La cellule surmonte cette difficulté en faisant intervenir ses topo-isomérases, qui catalysent la scission temporaire et le rescellement des brins d'ADN. Les coupures transitoires introduites par ces enzymes servent de pivot aux deux brins qui pivotent alors librement l'un autour de l'autre.

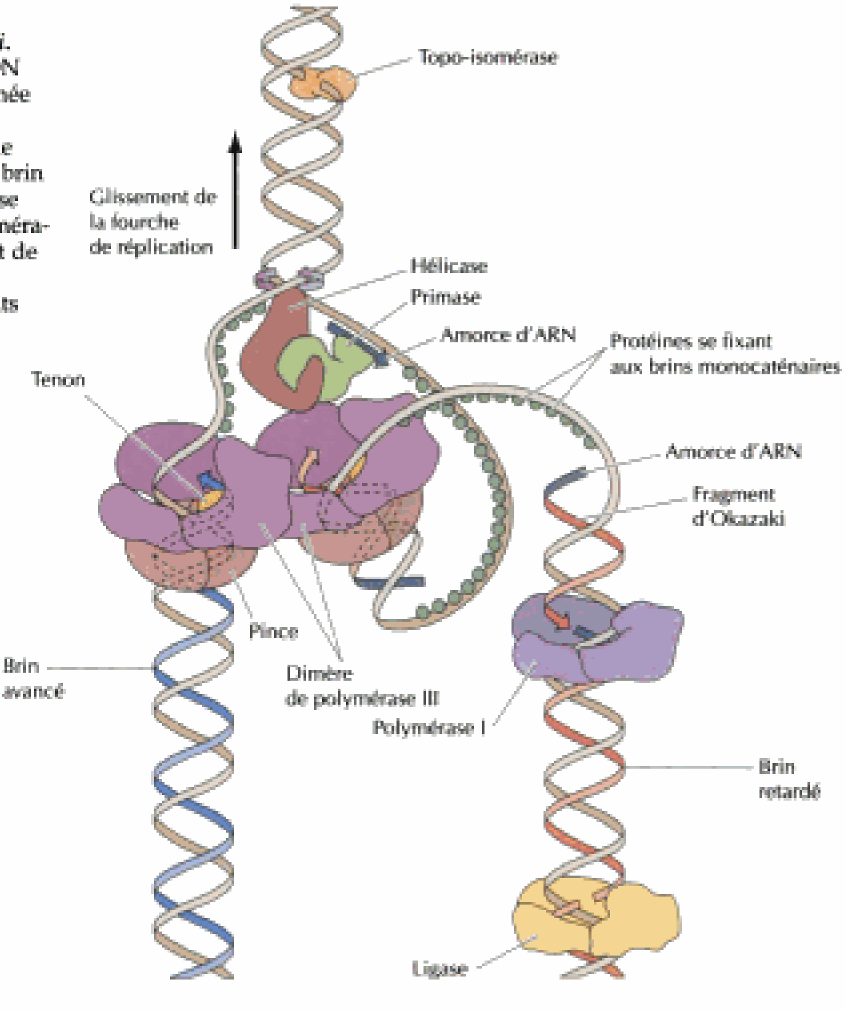


Figure 5.11
Modèle de fourche de réplication chez *E. coli.* L'hélicase, la primase et deux molécules d'ADN polymérase III effectuent la synthèse coordonnée des deux brins, avancé et retardé, d'ADN. La matrice du brin retardé est repliée en boucle de façon que la polymérase chargée de former le brin retardé migre dans le sens même dans lequel se déplace la fourche de réplication. La topo-isomérase permet la détorsion de la molécule en avant de la fourche ; l'ADN polymérase remplace les amorces d'ARN et la ligase soude les fragments d'Okazaki en arrière de la fourche.

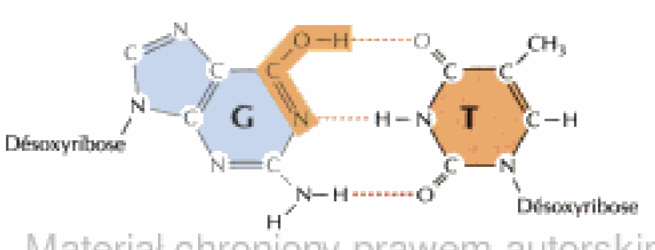
Fidélité de la réplication

Il est crucial pour la survie de la cellule que son ADN soit répliqué de façon précise ; d'ailleurs la fréquence de mutation de beaucoup de gènes semble indiquer que le processus de réplication n'introduit qu'une seule base erronée pour 10^9 à 10^{10} nucléotides incorporés. Cette fréquence d'erreurs est bien inférieure à celle prévue si on prend seulement en compte l'appariement des bases complémentaires. La conformation classique des bases d'acide nucléique est en équilibre avec d'autres conformations rares (tautomères) qui partagent des liaisons hydrogène avec un partenaire inapproprié (par exemple G avec T) à la fréquence de 1 sur 10^4 (figure 5.12). Le degré de fidélité bien supérieur atteint par la réplication est dû aux activités catalytiques de l'ADN polymérase.

Figure 5.12
Mésappariement entre des configurations rares adoptées par les bases d'acides nucléiques. Dans sa configuration normale, la guanine (G) partage des liaisons hydrogène singulières (lignes pointillées) avec la cytosine (C). Cependant, il arrive que G adopte une rare forme tautomérique qui partage des liaisons hydrogène avec la thymine (T).

Appariement G – C normal

G C
Désoxyribose
Désoxyribose



Il existe un moyen pour l'ADN polymérase de rendre la réplication le plus fidèle possible, c'est d'intervenir dans le choix de la base à insérer dans le brin naissant ; non seulement la polymérase catalyse-t-elle le transfert à la chaîne de tout nucléotide lié par des liaisons hydrogène au brin matrice, mais elle refuse d'incorporer une base mal appariée, probablement en s'adaptant à la conformation d'une paire de bases correcte. On ne saisit pas encore bien, au point de vue moléculaire, le mécanisme qui permet à la polymérase de refuser les bases inadéquates, mais cette sélectivité rendrait la réplication environ cent fois plus fidèle, réduisant la fréquence d'erreurs de quelque 10^{-4} à 10^{-6}.

L'autre mécanisme crucial qui confère à la réplication son haut degré de fidélité est la faculté qu'a l'ADN polymérase de **corriger sur épreuves** la chaîne naissante. Comme on l'a signalé, l'ADN polymérase de *E. coli* possède une activité d'exonucléase tant 3'→5' que 5'→3' ; l'exonucléase 5'→3' agit dans le sens de la synthèse d'ADN et sert à éliminer les amorces ARN des fragments d'Okazaki, tandis que l'exonucléase 3'→5' agit dans le sens opposé à l'allongement de la chaîne d'ADN et sert à relire et corriger les erreurs introduites dans la nouvelle chaîne d'ADN (figure 5.13). Cette correction sur épreuves réussit parce que l'ADN polymérase exige une amorce et ne sait pas démarrer une synthèse de chaîne *de novo* ; de cette façon, les amorces liées par des liaisons hydrogène à la matrice ont sa préférence, de sorte que les bases mésappariées, s'il s'en présente, sont éliminées par l'activité d'exonucléase 3'→5' de l'enzyme plutôt que d'être acceptées dans la chaîne. Cette activité catalytique d'exonucléase 3'→5' est présente aussi dans la polymérase III de *E. coli* ainsi que dans les polymérases δ et ε d'eucaryotes, qui excisent sélectivement les bases mésappariées, introduites à l'extrémité naissante d'une chaîne et, ce faisant, rendent la réplication 100 à 1000 fois plus précise.

La portée de la correction sur épreuve explique le fait que l'ADN polymérase exige des amorces et catalyse l'allongement de la chaîne d'ADN exclusivement dans le sens 5'→3'. En effet, quand le brin d'ADN est synthétisé de 5' en 3', l'énergie de polymérisation provient de la rupture du groupe 5'-triphosphate d'un désoxynucléotide triphosphate libre au moment où celui-ci est transféré au groupe 3'-OH de la chaîne naissante (voir figure 5.2). Si la chaîne croissait de 3' en 5', l'énergie de polymérisation devrait venir de la rupture du groupe 5'-triphosphate du désoxynucléotide terminal appartenant déjà à la chaîne ; cela rendrait impossible toute correction sur épreuve, car l'élimination d'un résidu nucléotidique mésapparié enlèverait de ce fait le groupe 5'-triphosphate donneur d'énergie pour l'allongement futur de la chaîne. Si donc l'incapacité de l'ADN polymérase à allonger les amorces autrement que dans le sens 5'→3' semble faire de la réplication un processus compliqué, cette contrainte est requise pour garantir une duplication sans faute du matériau génétique.

Alliée à la faculté de s'opposer à l'insertion d'une base inappropriée, l'activité que possède l'ADN polymérase de corriger ses épreuves suffit à réduire la fréquence d'erreurs de réplication à environ une base par milliard de bases incorporées.

Point de départ et amorçage de la réplication

Les ADN polymérases de procaryotes et d'eucaryotes commencent toutes à répliquer à partir d'une séquence appelée **origine de réplication**, un site particulier où vont se fixer spécifiquement les protéines qui amorcent le processus de réplication. La première origine de réplication fut découverte chez *E. coli*, chez lequel l'analyse génétique montrait que la réplication commence toujours en un site singulier du chromosome bactérien ; un examen ultérieur approfondi de ce site chez *E. coli* a révélé qu'il tenait dans 245 paires de bases, dont certains groupements servent à recevoir les protéines impliquées dans la réplicatiopn d'ADN (figure 5.14). L'étape clé de ce processus est la fixa-

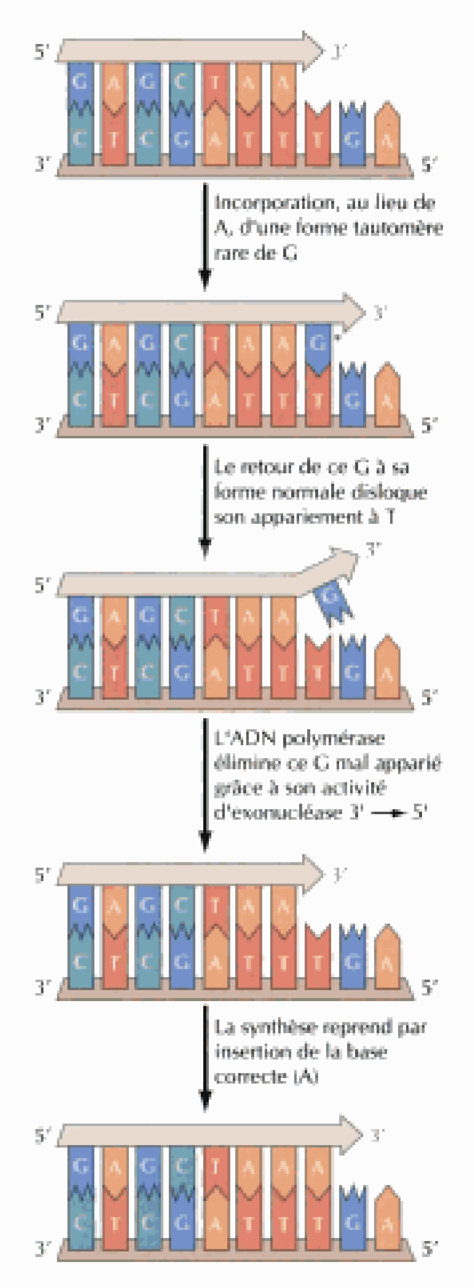


Figure 5.13
Correction sur épreuve par l'ADN polymérase. En se mésappariant avec un T du brin matrice, la forme tautomérique rare de G (G*) a été incorporée à la place de A ; en reprenant sa forme normale, G, cette base disloque son appariement, de sorte que ce G du bout 3' naissant perd ses liaisons hydrogène avec le brin matrice ; l'ADN polymérase reconnaît ce mésappariement et son activité exonucléasique 3'→5' enlève le résidu nucléotidique erroné, sans quoi la polymérase ne poursuivrait pas la synthèse de la chaîne naissante. Une fois éliminée la base G mésappariée, la synthèse reprend par l'introduction du nucléotide correct, A.

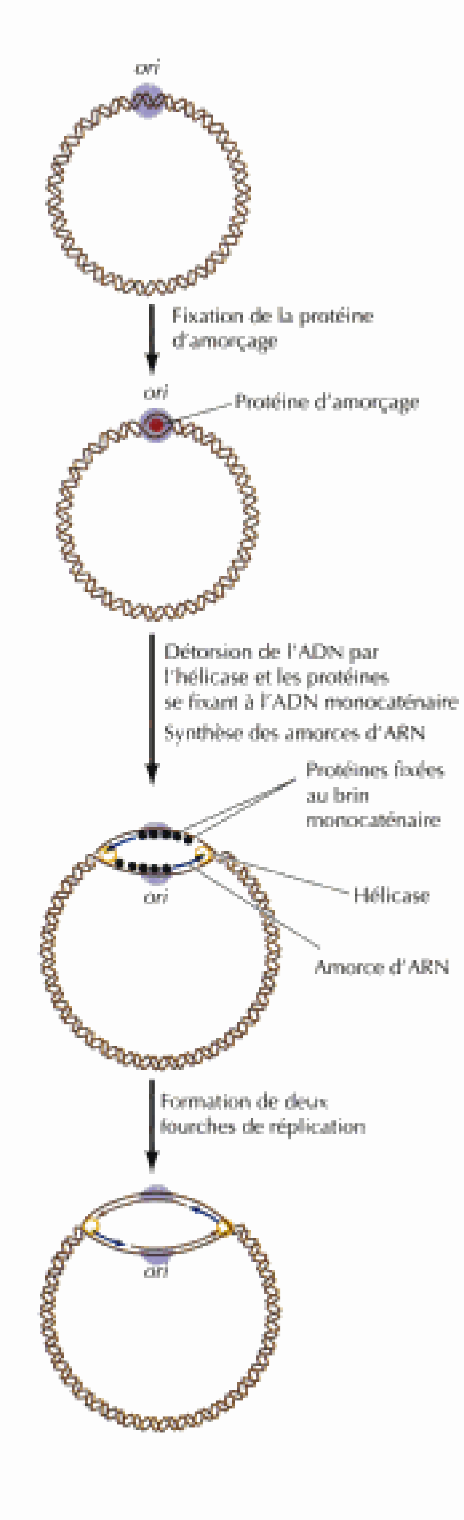


Figure 5.14
Origine de réplication chez *E. coli*. Sur le chromosome de *E. coli*, la réplication démarre en un seul endroit, appelé origine (*ori*). Une protéine d'amorçage commence par se lier à la séquence d'ADN *ori* et la matrice se détord en partie. L'ADN continue de se détordre, sous l'effet de l'hélicase et des protéines se fixant aux brins monocaténaires ; la primase synthétise alors les amorces ARN. Les deux fourches de réplication parties de l'origine migrent en sens opposés le long du chromosome fermé de *E. coli*.

tion d'une protéine d'amorçage à des séquences particulières de cette région ; cette protéine commence à détordre l'hélice d'ADN à partir de l'origine de réplication et attire les autres protéines en jeu dans la synthèse d'ADN ; puis une hélicase et les protéines se fixant à l'ADN monocaténaire achèvent de détordre les brins et mettent à nu la matrice d'ADN ; enfin, la primase commence à synthétiser les brins avancés. Il se forme deux fourches de réplication, qui migrent en sens opposés le long du chromosome fermé de *E. coli*.

On a pris, comme modèle, l'origine de réplication de plusieurs virus animaux, comme SV40, pour étudier l'amorçage de la synthèse d'ADN chez les eucaryotes. SV40 possède une seule origine de réplication (de 64 pb) qui fonctionne tant dans la cellule infectée que dans les extraits cellulaires. La réplication s'amorce grâce à une protéine virale (l'antigène T) qui se fixe à l'origine et sert en plus d'hélicase ; une protéine qui se fixe au brin d'ADN monocaténaire est requise pour stabiliser la matrice détordue, puis le complexe d'ADN polymérase α et de primase commence à synthétiser la chaîne d'ADN.

Si les génomes bactériens et viraux se répliquent entièrement à partir d'une seule origine, il en faut plusieurs pour que les plus grands génomes se répliquent dans un laps de temps raisonnable : le génome entier de *E. coli* (4×10^6 pb) par exemple, se réplique à partir de son unique origine en près de 30 minutes. Si les génomes de mammifère (3×10^9 pb) se répliquaient à la même vitesse à partir d'une seule origine de réplication, la réplication de leur ADN prendrait près de trois semaines (30 000 minutes). La gageure est d'autant plus lourde que l'ADN de mammifère est en fait dix fois plus lent à se répliquer que celui de *E. coli*, peut-être à cause du compactage de l'ADN eucaryotique sous forme de chromatine. Il n'empêche que les génomes des cellules de mammifère se répliquent en fait en quelques heures et cela parce que la synthèse d'ADN s'amorce simultanément en des milliers d'origines de réplication.

On a montré pour la première fois que les cellules d'eucaryotes répliquent leur ADN sur de nombreuses origines de réplication en cultivant des cel-

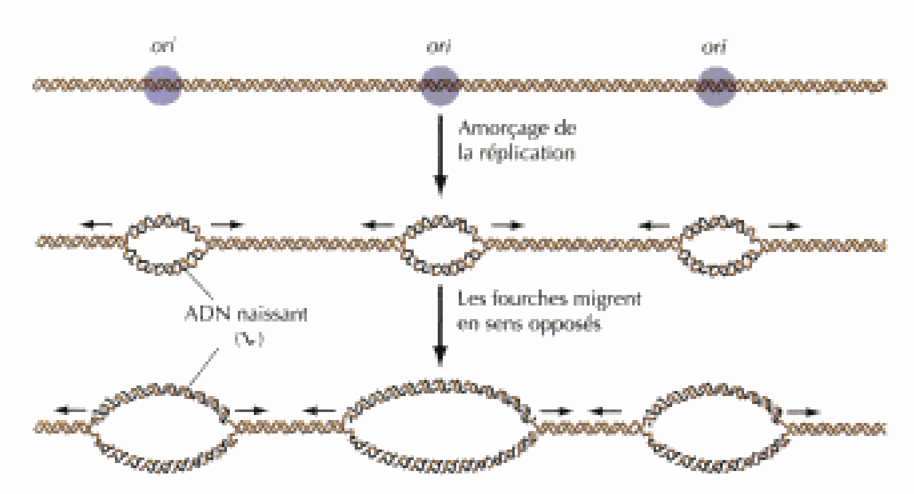


Figure 5.15
Origines de réplication dans un chromosome d'eucaryote. La réplication démarre en de nombreuses origines (*ori*), dont chacune produit deux fourches de réplication.

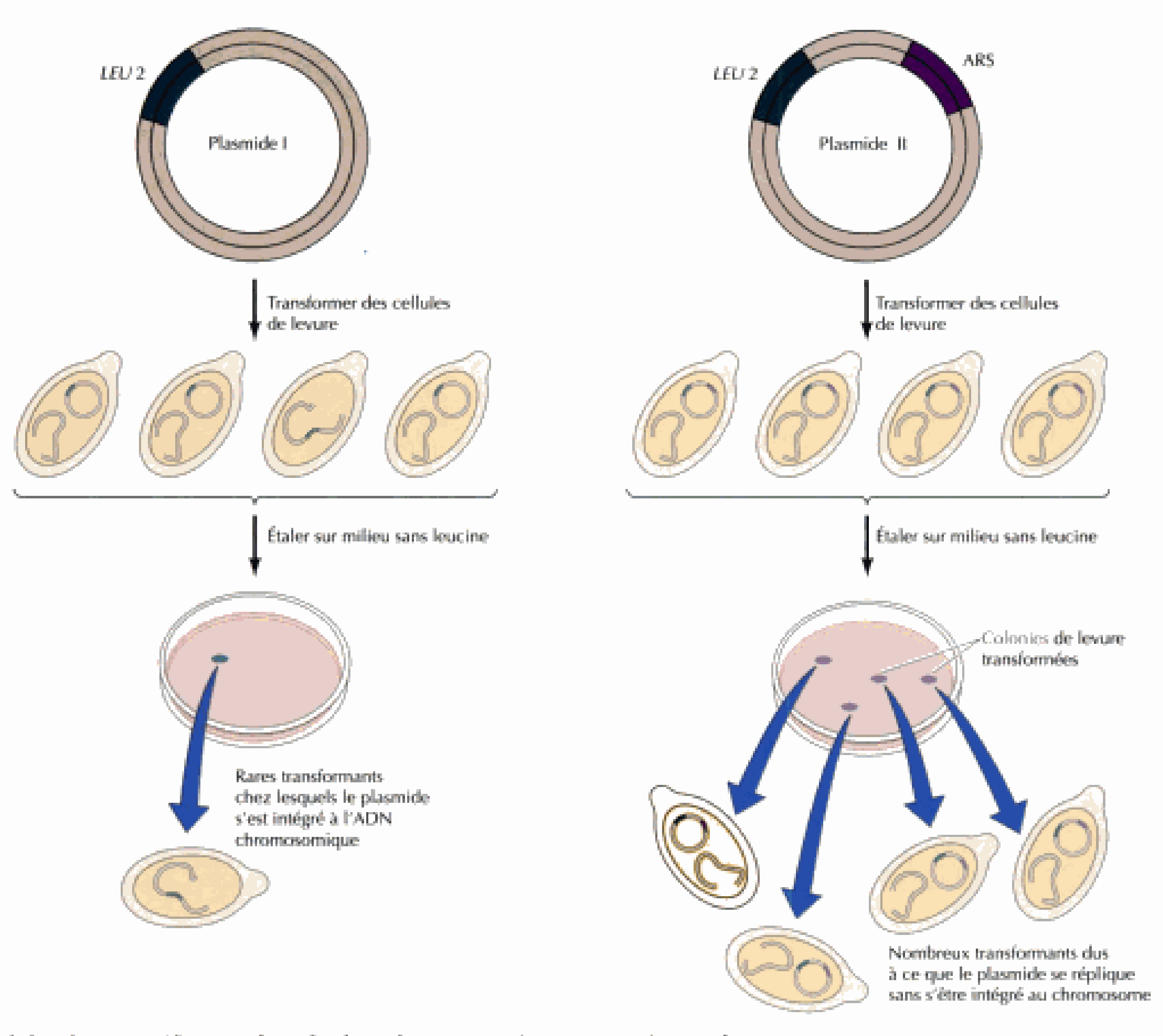


Figure 5.16
Identification des origines de réplication chez la levure. Les plasmides I et II contiennent tous deux le gène marqueur de sélection *LEU2*, qui rend la cellule capable de pousser dans un milieu dépourvu de leucine. Cependant, seul le plasmide II porte une origine de réplication (ARS). Les levures transformées par le plasmide I ne donnent que de rares transformants chez lesquels le plasmide s'est intégré à l'ADN chromosomique, tandis que le plasmide II est capable de se répliquer sans s'intégrer au chromosome de la levure (réplication autonome), de sorte que son introduction dans la cellule produit beaucoup plus de transformants.

lules de mammifère pendant des laps de temps croissants en présence de désoxythymidine radioactive, puis en procédant à une autoradiographie pour déceler l'ADN néoformé ; on a vu ainsi que la synthèse d'ADN part de nombreuses régions, d'où elle progresse dans les deux sens le long du chromosome (figure 5.15). Dans les cellules de mammifère, les origines de réplication sont espacées d'environ 50 à 300 kb, autrement dit, le génome, humain par exemple, possède 30 000 origines de réplication ; le génome des eucaryotes moins évolués possède aussi de multiples origines ; la réplication du génome de levure s'amorce sur une multitude d'origines qui sont espacées d'environ 40 kb.

C'est chez les levures qu'on a le mieux étudié les origines de réplication du chromosome eucaryotique ; ces régions y ont été identifiées en tant que séquences dont dépend la réplication des plasmides dans les cellules transformées (figure 5.16), observation qui sert de test physiologique de ces séquences et a permis d'isoler plusieurs éléments de ce type (**séquences à réplication autonome** ou **ARS**). On a vérifié leur rôle en tant que origine de réplication par analyse biochimique directe, non seulement dans des plasmides, mais aussi dans l'ADN des chromosomes de levures.

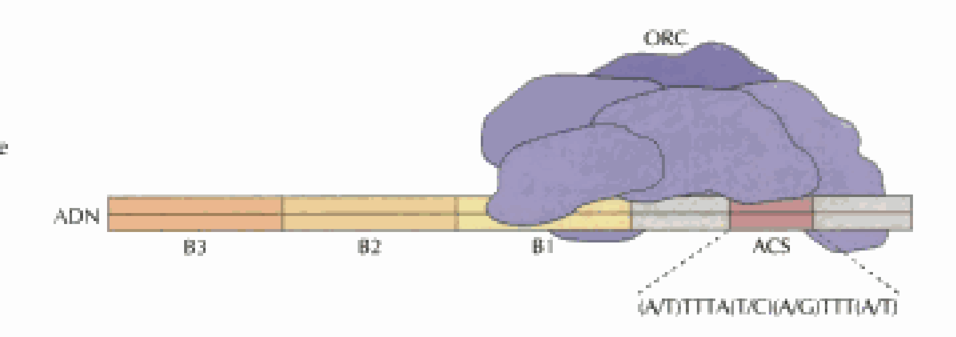


Figure 5.17
Élément ARS de levure. L'élément comporte la séquence consensus ARS de 11 paires de bases (ACS), qui est le site de fixation spécifique du complexe de l'origine de réplication (ORC). Les trois éléments (B1, B2 et B3), pris isolément, sont sans effet, mais de concert, contribuent à la fonction de ARS en ceci qu'ils se détordent facilement en ADN monocaténaire.

Les ARS actifs comprennent environ 100 pb, dont un noyau de séquence de 11 pb commun à toute une série de ARS (figure 5.17) ; ce noyau est critique pour la fonction des ARS et on a remarqué qu'il est le site de fixation d'un complexe protéique (le **complexe de l'origine de réplication** ou **ORC**) qui amorce la réplication de l'ADN de levure au niveau des origines de réplication. Chez les levures, la réplication de l'ADN s'amorce donc de la même manière que chez les procaryotes et les virus d'eucaryotes, c'est-à-dire *via* un amorceur protéique qui se fixe spécifiquement aux séquences des origines de réplication.

Si on connaît bien les éléments ARS de levure, on connaît moins bien la nature des origines de réplication des eucaryotes plus évolués et on n'a pas encore caractérisé celles des cellules animales. Néanmoins on a récemment trouvé des protéines apparentées aux protéines ORC de levure chez une série d'eucaryotes, comme la drosophile, *C. elegans*, *Arabidopsis* et l'Homme, ce qui suggère que ces protéines sont des amorceurs universels de la réplication de l'ADN eucaryotique. Une meilleure compréhension de la nature des protéines ORC faciliterait sans aucun doute l'isolement et la caractérisation des origines de réplication chez les eucaryotes plus élaborés.

Télomères et télomérase : réplication des bouts du chromosome

Le fait que les ADN polymérases n'allongent les amorces que dans le sens 5'→3' les rend incapables de répliquer jusqu'au bout les extrémités d'une molécule ouverte d'ADN. Il doit donc exister un mécanisme adapté à la réplication de ces séquences terminales des chromosomes d'eucaryotes. Ces séquences (**télomères**) consistent en répétitions en tandem d'un ADN de séquence simple (voir chapitre 4). Elles sont répliquées par un enzyme particulier (une télomérase ; le terme correct est : télomère synthétase) qui catalyse leur synthèse en l'absence de matrice d'ADN.

La télomérase est une **transcriptase inverse**, appartenant à une classe d'ADN polymérases découverte d'abord chez les rétrovirus (voir chapitre 3), qui synthétise de l'ADN sur une matrice d'ARN. Il est important de noter que c'est la télomérase elle-même, en tant que complexe enzymatique, qui porte sa propre matrice d'ARN, complémentaire des séquences répétitives du télomère. En utilisant un ARN comme matrice, l'enzyme produit une série de séquences télomériques qui régénèrent les télomères en l'absence de matrice d'ADN classique.

Le mécanisme d'action de la télomérase fut découvert en 1985 par Carol Greider et Elisabeth Blackburn, au cours de recherches sur le protozoaire *Tetrahymena* (figure 5.18). La télomérase de ce protozoaire comprend un ARN de 159 nucléotides dont une partie possède la séquence 3'-AACCCCAAC-5' ; celle-ci est complémentaire de la répétition télomérique 5'-TTGGGG-3' de *Tetrahymena* et sert de matrice pour la synthèse de l'ADN télomérique. En utilisant son ARN comme matrice, la télomérase arrive à prolonger, de la longueur d'un élément modulaire répétitif, l'extrémité 3' d'un ADN au-delà de sa longueur originelle. Le brin complémentaire va être alors synthétisé par le

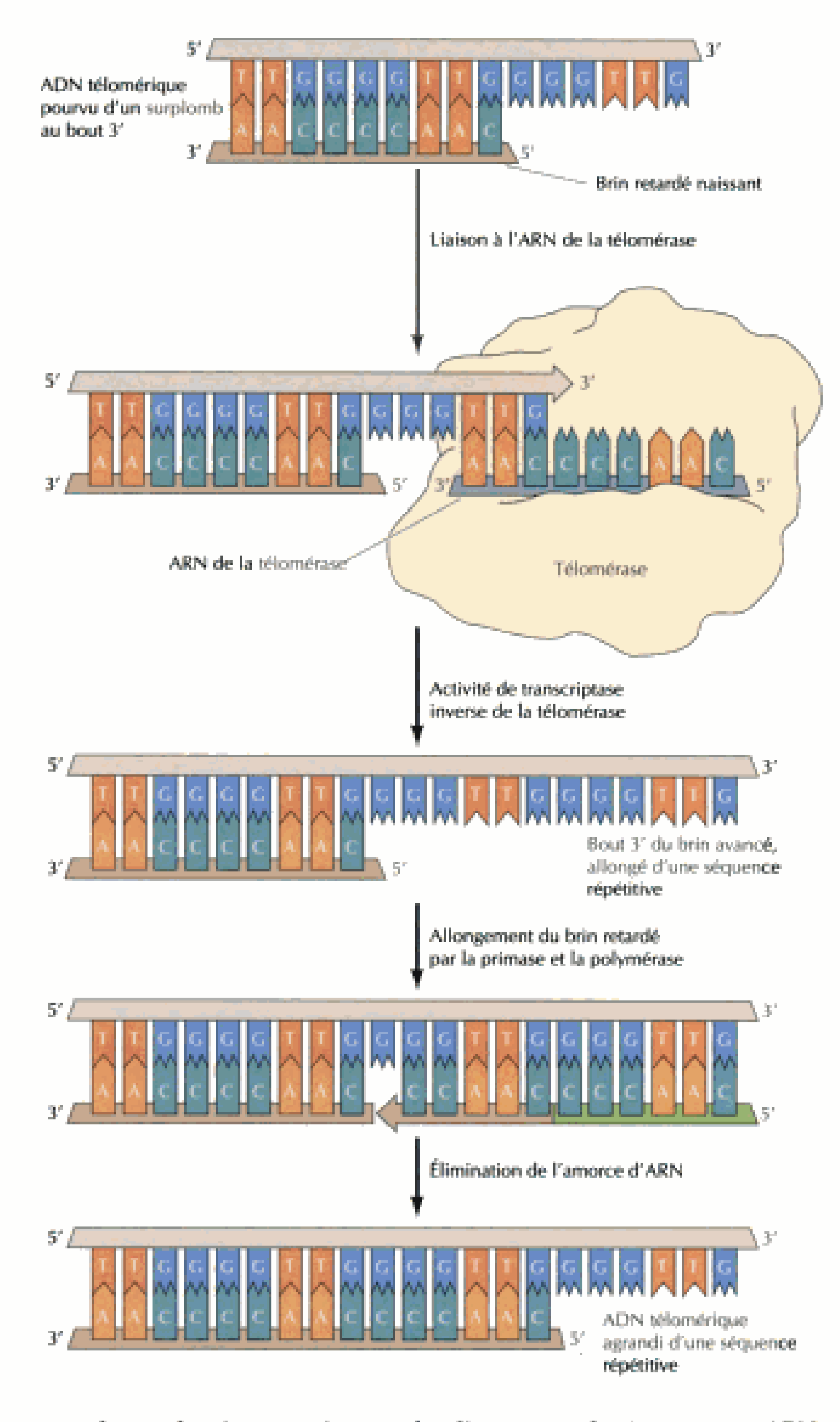


Figure 5.18
Action de la télomérase. L'ADN télomérique est une séquence simple répétitive pourvue d'une extrémité 3' débordant sur le brin avancé néoformé. En son site actif, la télomérase (ou mieux, la synthétase du télomère) comporte sa propre molécule d'ARN, complémentaire à l'ADN télomérique. Le surplomb d'ADN télomérique se lie à l'ARN de la télomérase, lequel sert de matrice pour allonger d'un module répétitif le brin avancé. Le brin retardé d'ADN télomérique sera allongé ensuite classiquement sur une amorce d'ARN par l'ADN polymérase.

complexe polymérase-α-primase selon l'amorçage classique sur un ARN. L'élimination de l'amorce ARN laisse subsister un surplomb 3' d'ADN chromosomique qui sera de nouveau allongé sous l'action de la télomérase.

On a retrouvé une télomérase chez de nombreux eucaryotes et on a cloné les gènes des ARN de la télomérase de *Tetrahymena*, de la levure, de la souris et de l'Homme. L'ARN de toutes ces télomérases comporte des séquences complémentaires à la séquence télomérique répétitive de l'orga-

nisme correspondant (voir tableau 4.3). En outre, quand on introduit des gènes mutants d'ARN de télomérase chez des levures, on constate que les séquences répétitives du télomère chromosomique ont adopté la séquence complémentaire de la séquence mutée, ce qui prouve directement le rôle joué par le télomère dans la survie des extrémités des chromosomes d'eucaryotes.

RÉPARATION DE L'ADN

Comme toute autre molécule, l'ADN est sujet à tout une série de réactions chimiques, mais, puisqu'il est l'unique exemplaire permanent du génome cellulaire, toute altération de sa structure aura des suites bien plus dramatiques qu'un dommage touchant un autre composant cellulaire, comme les ARN ou les protéines. Les mutations sont parfois dues à l'incorporation de bases inadéquates lors de la réplication de l'ADN, mais l'ADN subit aussi diverses modifications chimiques, soit spontanées (figure 5.19), soit produites par des substances chimiques ou des radiations (figure 5.20). Il arrive que ces lésions de l'ADN bloquent la réplication ou la transcription et accroissent la fréquence des mutations — un effet incompatible avec la per-

Figure 5.19
Dommages subis spontanément par l'ADN. On connait deux sortes de lésions spontanées subies par l'ADN : la désamination des adénine, cytosine et guanine (A) et la dépurination (perte de base purinique) due à une scission de la liaison unissant une base purinique au désoxyribose ; cette perte de purine introduit un site apurinique dans l'ADN (B). dGMP = monophosphate de désoxyguanosine.

(A) **Absorption de lumière UV**

Thymines adjacentes dans l'ADN

Dimère de thymine

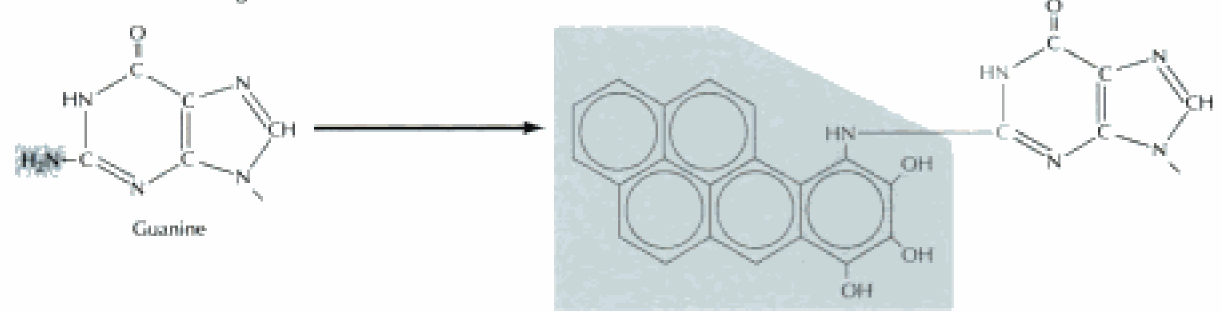
Anneau cyclobutane

(B) **Alkylation**

Guanine

O^6-Méthylguanine

(C) **Réaction avec des cancérogènes**



Addition d'un groupe chimique encombrant

Figure 5.20
Quelques types de dommages infligés à l'ADN par des radiations et des substances chimiques. (A) La lumière UV provoque la formation de dimères de pyrimidine, dans lesquels deux pyrimidines adjacentes (par exemple, deux thymines) sont jointes par un cycle cyclobutane. (B) Une alkylation consiste en l'addition d'un groupe méthyle ou éthyle en différentes positions d'une base de l'ADN. Ici, l'alkylation de la position O^6 de la guanine produit la O^6-méthylguanine. (C) Beaucoup de cancérogènes (par exemple le benzo(*a*)pyrène) réagissent avec les bases de l'ADN, en formant de volumineux adduits chimiques dans la molécule d'ADN.

pétuation de la cellule. Pour garantir l'intégrité de leur génome, celles-ci ont trouvé moyen de réparer leur ADN lésé de deux manières différentes : (1) en renversant directement la réaction qui a endommagé l'ADN et (2) en éliminant les bases endommagées puis en les remplaçant, par une nouvelle synthèse de la séquence d'ADN concernée. Si la réparation de l'ADN échoue, la cellule tient en réserve d'autres mécanismes capables de remédier au dommage.

Renversement direct des lésions subies par l'ADN

La plupart des lésions subies par l'ADN sont réparées par élimination des bases endommagées et resynthèse de la zone excisée. Il arrive cependant que certaines lésions se réparent par renversement direct de la réaction qui a causé le dommage, une voie qui semble plus efficace pour des types particuliers de dommages qui se produisent souvent. Seuls quelques types de lésions sont réparés de cette façon, notamment les dimères de pyrimidine,

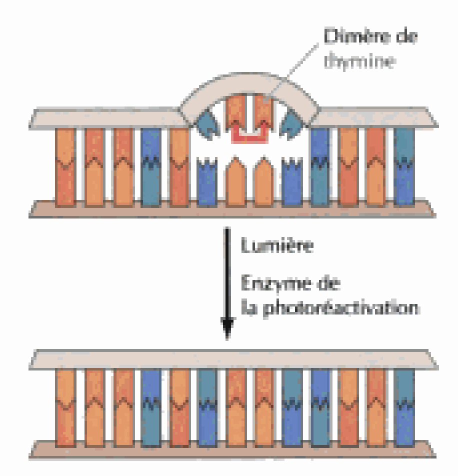


Figure 5.21
Réparation directe des dimères de thymine. La cellule répare par réactivation les dimères de thymine produits par les UV, en utilisant l'énergie de la lumière visible pour rompre les liaisons du noyau cyclobutane.

produits par les rayons UV, et les alkylguanine modifiées par éthylation/méthylation en position O^6 du noyau purine.

La lumière UV est une des causes principales de lésions de l'ADN ; ces lésions ont fait l'objet des études les plus poussées quant aux mécanismes qui les réparent. L'importance de ces mécanismes est illustrée par le fait que l'exposition à la lumière UV solaire est la cause de presque tous les cancers cutanés humains. Le type principal de dommage causé par les UV est la formation de **dimères de pyrimidine**, réaction dans laquelle deux résidus pyrimidine adjacents d'un même brin d'ADN se condensent par formation d'un cycle cyclobutane entraînant la saturation des liaisons doubles entre les carbones 5 et 6 (voir figure 5.20A). En déformant la structure de la chaîne d'ADN, ces dimères empêchent la transcription ou la réplication de dépasser le site endommagé, de sorte que leur réparation conditionne la faculté qu'aura la cellule de survivre à une irradiation par les UV. L'un des mécanismes de réparation des dimères de pyrimidine induits par les UV est le renversement pur et simple de la réaction de dimérisation, un processus appelé **photoréactivation** du fait que l'énergie fournie par la lumière visible sert à rompre le noyau cyclobutane (figure 5.21). Les pyrimidines originelles n'ont pas quitté le brin d'ADN et ont repris leur état naturel. Comme on doit s'y attendre du fait que divers types de cellules sont souvent endommagés par les UV solaires, leur réparation par photoréactivation est courante chez de nombreuses cellules procaryotiques et eucaryotiques, parmi lesquelles *E. coli*, les levures et certaines espèces de plantes et d'animaux. Il est étonnant que le processus de photoréactivation ne soit pas universel : un grand nombre d'espèces, l'Homme y compris, sont dépourvues de ce mécanisme de réparation.

Un autre genre de réparation directe de l'ADN concerne les lésions dues à la réaction de l'ADN avec les agents alkylants. Ceux-ci sont des réactifs qui modifient une base de l'ADN en lui transférant un groupe méthyle ou éthyle (voir figure 5.20B). Un type très important de lésion est la méthylation de la position O^6 de la guanine, car le produit formé, la O^6-méthylguanine s'apparie non pas à la cytosine, mais à la thymine. Cette lésion sera éventuellement réparée par un enzyme appelé O^6-méthylguanine méthyltransférase, qui transfère le groupe méthyle de ce substrat à un résidu cystéine de son site actif (figure 5.22) ; ainsi est restauré le résidu guanine originel et éliminée cette modification chimique à effet mutagène. On trouve des enzymes qui catalysent cette réaction de réparation directe chez un grand nombre de procaryotes et d'eucaryotes, l'Homme compris.

Réparation par excision

Si la réparation directe est un bon moyen de pallier certains types de lésions de l'ADN, la réparation par excision est le moyen qu'emploie le plus souvent la cellule pour réparer tout une série de modifications chimiques de l'ADN, au point que les diverses sortes de réparation par excision constituent les mécanismes de réparation les plus importants des cellules procaryotiques et eucaryotiques. Dans une réparation par excision, l'ADN altéré est reconnu puis excisé soit sous forme de bases libres, soit sous forme de nucléotides. La lacune ainsi formée se comble par synthèse d'un nouveau brin d'ADN, en utilisant comme matrice le brin complémentaire intact. Pour contrecarrer toutes les espèces de dommages que peut subir l'ADN, la cellule dispose de trois types de réparation par excision, à savoir excision de bases, excision de nucléotides ou élimination de mésappariement.

Un bon exemple de **réparation par excision de base** est celui où les enzymes reconnaissent dans l'ADN une base modifiée, par exemple un uracile, et l'excisent (figure 5.23). L'uracile se forme de deux façons : (1) soit il résulte d'une insertion exceptionnelle d'uracile (à partir de dUTP, désoxyuridine triphosphate) au lieu de thymine dans le brin naissant, soit (2) il se

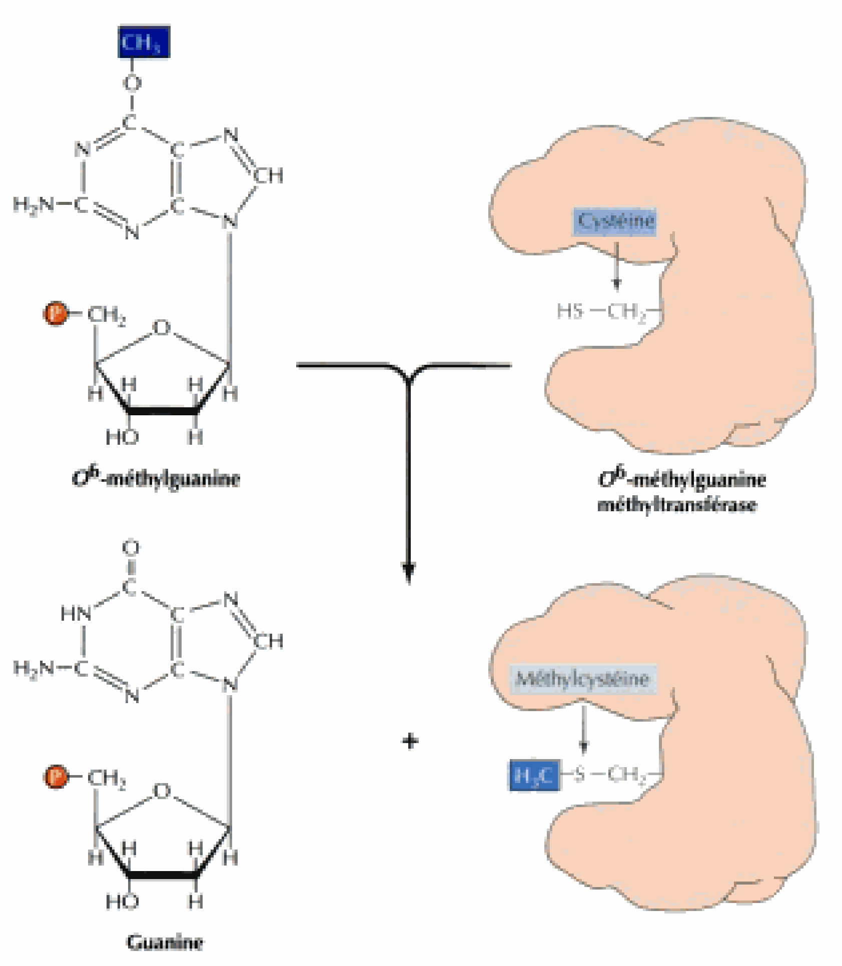
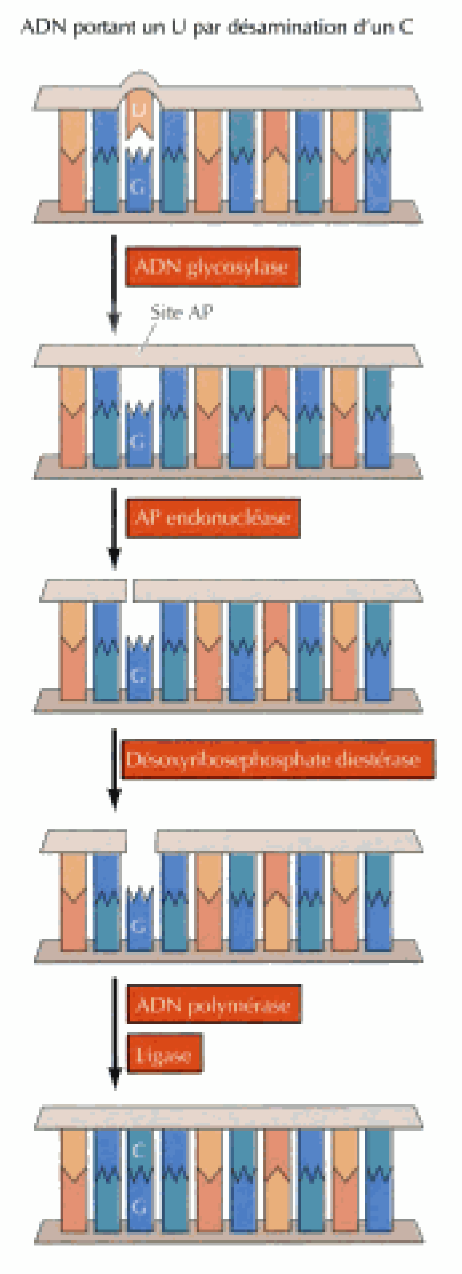


Figure 5.22
Réparation de la O^6-méthylguanine. La O^6-méthylguanine méthyltransférase transfère le groupe méthyle de la O^6-méthylguanine à un résidu cystéine de son site actif.



forme sur place par désamination d'une cytosine (voir figure 5.19A). Ce mécanisme-ci a une portée biologique plus grande, car en violant la règle d'appariement de bases complémentaires, il devient un événement mutagène. L'excision d'un résidu uracile de l'ADN est catalysée par l'**ADN glycosylase**, un enzyme qui rompt la liaison entre la base et le désoxyribose du squelette sucre-phosphate. La réaction libère de l'uracile et laisse subsister un site apyrimidinique, c'est-à-dire un résidu ribosyle dépourvu de base. Les ADN glycosylases s'attaquent aussi à d'autres bases anormales, par exemple à l'hypoxanthine, formée par désamination de l'adénine, aux dimères de pyrimidine, aux purines alkylées autres que la O^6-guanine ainsi qu'aux bases touchées par un oxydant ou par des radiations ionisantes.

Figure 5.23
Réparation par excision de base. Dans cet exemple, l'uracile (U) provient de la désamination d'une cytosine (C) ; il est donc en face d'une guanine (G) dans le brin ADN complémentaire. La liaison reliant l'uracile au désoxyribose est rompue par une ADN glycosylase, en formant un sucre dépourvu de base dans la chaîne ADN (site AP). Ce site sera reconnu par une AP endonucléase, qui coupe la chaîne d'ADN. Le désoxyribose restant est enlevé par une désoxyribosephosphate diestérase. La lacune ainsi formée est comblée ensuite par l'ADN polymérase et la coupure scellée par l'ADN ligase, de sorte que la base correcte (C) sera introduite en face du G.

L'action d'une glycosylase laisse dans l'ADN un site dépourvu de pyrimidine ou de purine (appelé site AP). Ces sites AP se forment aussi par perte spontanée de base purique (voir figure 5.19B), réaction qui se passe normalement à vitesse significative dans la cellule ; on estime, par exemple, que l'ADN de chaque cellule humaine est dépouillé de plusieurs milliers de bases puriques par jour. Ces sites AP sont réparés par une **endonucléase AP** qui coupe la chaîne contre le site AP (figure 5.23). Le groupe désoxyribosyle restant est ensuite éliminé et la lacune d'une base réparée par l'ADN polymérase et la ligase.

Si les ADN glycosylases ne s'attaquent qu'à des formes singulières de bases lésées, d'autres systèmes de réparation par excision reconnaissent toutes sortes de bases endommagées qui déforment la molécule d'ADN, par exemple les dimères de pyrimidine produits par les UV ou les gros substituants transférés aux bases de l'ADN par toutes sortes de substances cancérogènes (voir figure 5.20C). Ce processus très répandu de réparation d'ADN est connu sous le nom de **réparation par excision de nucléotide**, puisque la base endommagée (par exemple, le dimère de pyrimidine) est éliminé sous forme d'un oligonucléotide contenant la lésion (figure 5.24).

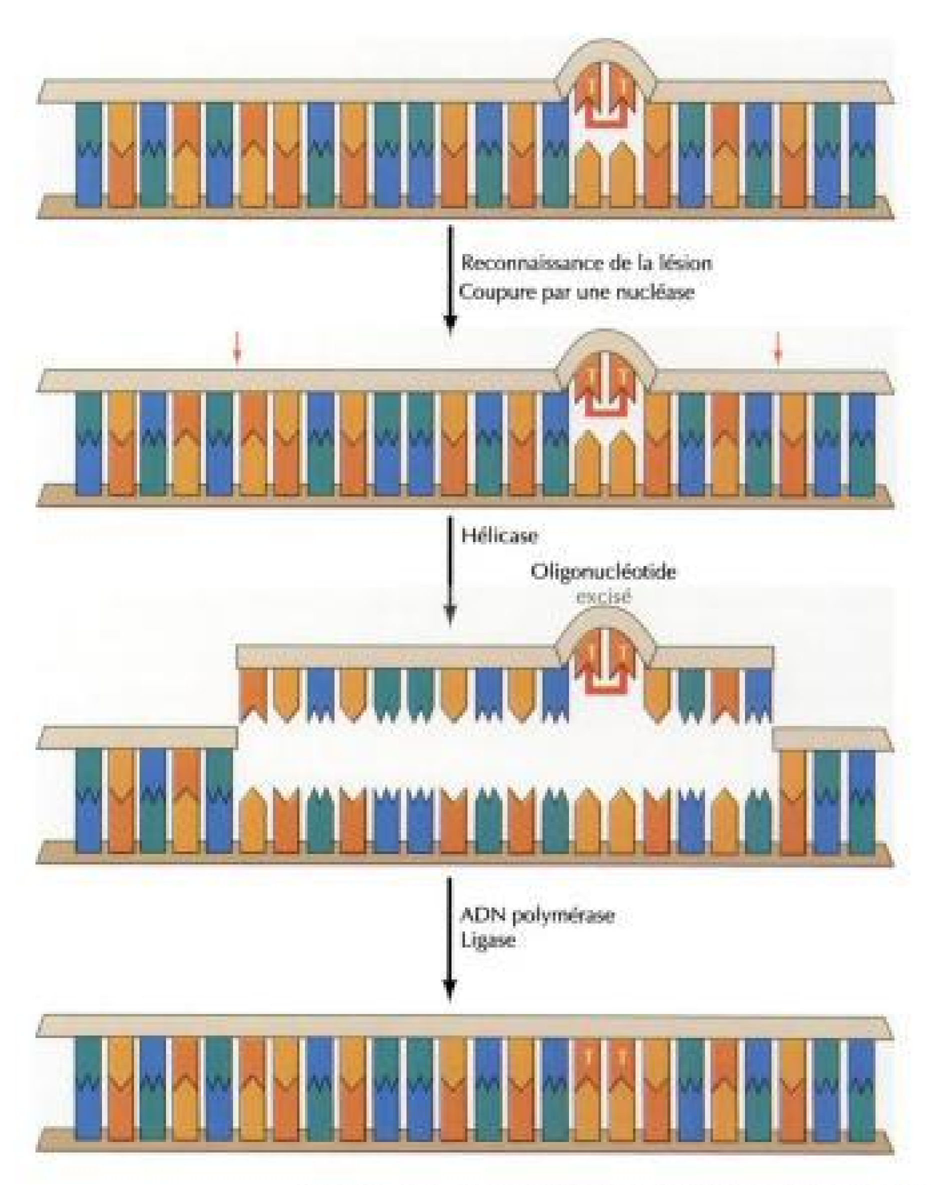


Figure 5.24
Réparation d'un dimère de thymine par excision de nucléotide. L'ADN lésé est reconnu et coupé de chaque côté du dimère de thymine par des nucléases 3' et 5'. Une fois l'hélice détordue par une hélicase, l'oligonucléotide portant le dimère de thymine est excisé. La lacune résultante est alors comblée par l'ADN polymérase et la coupure soudée par la ligase.

Chez *E. coli*, la réparation par excision de nucléotide est catalysée par les produits de trois gènes (*uvr A, B* et *C*), mis au jour du fait que leurs mutations rendent la cellule très sensibles aux rayons UV. La protéine UvrA reconnaît le site lésé de l'ADN et y attire UvrB et UvrC ; ces derniers incisent alors la chaîne respectivement du côté 3′ et du côté 5′ de la lésion, avec départ d'un oligonucléotide de 12 ou 13 résidus. On désigne souvent ce complexe UvrABC du terme de **excinucléase,** qui rappelle son pouvoir d'exciser un oligonucléotide. Il faut ensuite une hélicase pour détacher l'oligonucléotide endommagé de la molécule d'ADN bicaténaire, puis la lacune ainsi formée est comblée par l'ADN polymérase I et les soudures effectuées par l'ADN ligase.

On a aussi étudié soigneusement les systèmes de réparation par excision chez les eucaryotes, notamment chez les levures et chez l'Homme. En isolant des mutants hypersensibles aux UV, on y a identifié, comme chez *E. coli*, plusieurs gènes impliqués dans la réparation de l'ADN (appelés gènes *RAD*, pour sensibilité aux *rad*iations). Chez l'Homme, on a surtout découvert ces gènes en examinant les individus souffrant de maladies congénitales dues à des défauts de réparation de l'ADN endommagé. La mieux connue de ces maladies est le xeroderma pigmentosum (XP), une maladie rare, puisqu'elle frappe seulement un individu sur 250 000. Ces malades sont très sensibles aux UV et sont envahis de multiples tumeurs aux endroits de la peau exposée aux rayons solaires. Une importante découverte de James Cleaver montrait en 1968 que les cellules de patients XP en culture étaient incapables de réparer leur ADN par excision de nucléotides ; non seulement cette observation indiquait pour la première fois un rapport entre réparation de l'ADN et cancer, mais elle suggérait que les cellules XP en culture pouvaient servir de système expérimental pour étudier les gènes humains en jeu dans la réparation de l'ADN. On est arrivé à identifier ces gènes grâce non seulement aux cellules XP, mais aussi à deux maladies humaines dues à des défauts de réparation de l'ADN (le syndrome de Cockayne et la trichothiodystrophie) ainsi qu'à des lignées de cellules de souris sensibilisées aux UV par mutation. Dès que les chercheurs purent cultiver des cellules de mammifère incapables de réparer leur ADN, ils clonèrent les gènes de réparation, grâce à la capacité qu'avaient les allèles de type sauvage transférés aux cellules mutantes de rendre à celles-ci leur sensibilité normale aux UV ; cette voie permettait enfin d'étudier expérimentalement chez les mammifères le mécanisme de réparation par excision de nucléotide.

Le clonage moléculaire a maintenant identifié plusieurs gènes de réparation (désignés XPA à XPG) qui sont mutés chez les individus atteints de xeroderma pigmentosum, et dans certains cas de syndrome de Cockayne, de trichothiodystrophie et chez les cellules de rongeurs mutantes hypersensibles aux UV. Le tableau 5.1 reprend les enzymes codés par ces gènes. Certaines cellules de rongeurs très sensibles aux UV possèdent encore un autre gène de réparation, appelé *ERCC1* (pour *e*xcision *r*epair *c*ross *c*omplementing), qui s'est avéré non muté dans des maladies humaines apparentées. S'il est remarquable que les protéines codées par ces gènes humains de réparation ressemblent de près aux protéines codées par les gènes RAD de levure, cela est dû au fait que la réparation par excision de nucléotide s'est strictement maintenue dans toute la série des eucaryotes.

Dès qu'on eut cloné des gènes de réparation chez les levures et l'Homme, on purifia les protéines codées par ces gènes et on mit au point des systèmes pour suivre *in vitro* le processus de réparation. À part quelques étapes encore obscures, ces travaux ont abouti à l'élaboration d'un modèle de base expliquant le processus de réparation par excision de nucléotides chez les eucaryotes. Chez les mammifères, la protéine XPA amorce la réparation en reconnaissant l'ADN endommagé et en s'associant à d'autres protéines en jeu dans le processus, notamment les protéines XPB et XPD, qui agissent en

Tableau 5.1 Enzymes mis en jeu dans la réparation par excision de nucléotide

Homme	Souris	Fonction
XPA	RAD14	Reconnaissance de la lésion
XPB	RAD25	Hélicase
XPC	RAD4	Liaison à l'ADN
XPD	RAD3	Hélicase
XPF	RAD1	Nucléase 5′
XPG	RAD2	Nucléase 3′
ERCC1	RAD10	Dimère avec XPF

tant que hélicases pour détordre l'ADN. En outre, en se fixant à l'ADN endommagé, XPA attire XPF (un protomère associé à ERCC1) et XPG vers le complexe de réparation. XPF et XPG sont des endonucléases qui coupent l'ADN respectivement du côté 5' et du côté 3' du site endommagé ; elles excisent un oligonucléotide d'environ 29 résidus. Il semble que la lacune ainsi formée se comble sous l'effet des polymérases δ ou ε (associées à RFC et PCNA), puis que la ligase ressoude l'incision.

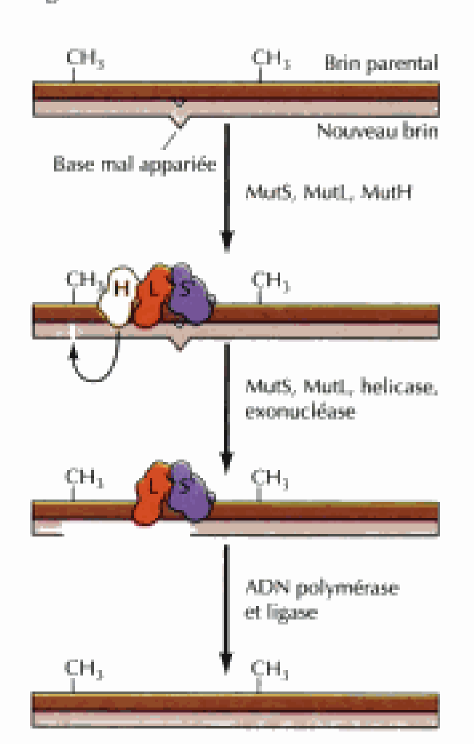
On peut s'étonner d'avoir découvert une relation entre la réparation par excision de nucléotide et la transcription de gènes ; on doit cette découverte à des expériences montrant que les brins d'ADN transcrits sont réparés plus vite que les brins non transcrits tant chez *E. coli* que chez les mammifères. Comme tout dommage à la chaîne d'ADN empêche sa transcription, il est vraisemblable que ce couplage de la transcription à la réparation profite à la cellule puisqu'elle répare de préférence les brins activement exprimés. Bien qu'on connaisse encore mal le mécanisme moléculaire de ce couplage transcription-réparation, il est remarquable que les hélicases XPB et XPD fassent aussi partie d'un facteur de transcription multimérique (TFIIH) requis pour démarrer la transcription des gènes d'eucaryotes (voir chapitre 6). Ces hélicases seraient donc indispensables à la détorsion de l'ADN tant lors de la transcription que lors de la réparation par excision de nucléotide, preuve s'il en est de la relation biochimique directe entre les deux processus. Notons encore que chez certains patients manifestant le syndrome de Cockayne, on a trouvé des mutations d'une autre hélicase, CSB ; quand celle-ci est rendue inerte par mutation, c'est la réparation préférentielle des brins d'ADN transcrits qui est touchée, suggérant que CSB agirait comme facteur de couplage entre la transcription et la réparation.

Un troisième système de réparation par excision reconnaît les bases qui, bien que mal appariées, ont été incorporées à la chaîne d'ADN. Ces bases sont pour la plupart éliminées quand l'ADN polymérase corrige sur épreuve le brin naissant ; les bases mal placées qui ont échappé à cette correction sur épreuves seront éliminées plus tard par un système de **réparation des mésappariements** qui scrute le brin d'ADN néoformé. Dès qu'ils rencontrent un mésappariement, les enzymes de ce système de réparation l'identifient et l'excisent du nouveau brin d'ADN, corrigeant ainsi l'erreur introduite, pour rétablir la séquence originelle.

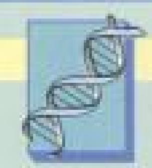
Le système de réparation des mésappariements de *E. coli* peut distinguer l'ADN parental de l'ADN néoformé du fait que l'ADN de cette bactérie est modifié par méthylation des résidus adénine des séquences GATC en résidu 6-méthyladénine (figure 5.25). Puisque la méthylation suit la réplication, les brins d'ADN nouveaux, n'étant pas méthylés, sont spécifiquement reconnus par les enzymes de réparation des mésappariements. Cette réparation est entamée par la protéine MutS, qui détecte le mésappariement et recrute deux autres protéines MutL et MutH. L'endonucléase MutH coupe alors dans la séquence GATC du brin d'ADN non méthylé ; le couple MutL et MutS, de concert avec une exonucléase et une hélicase, dépolymérisent ensuite l'ADN entre la coupure et le mésappariement, puis la lacune est réparée par les ADN polymérase et ligase.

Les eucaryotes possèdent un système de réparation identique, mais on ignore le mécanisme qui permet à la cellule eucaryote d'identifier l'ADN nouvellement répliqué ; on sait seulement que la réparation des mésappariements, tant chez la levure que chez les mammifères, requiert des gènes apparentés aux gènes *MutS* et *MutL* de *E. coli*. L'importance de ce système de réparation est illustrée de manière frappante par le fait que les mutations des homologues humains de *MutS* et *MutL* sont responsables d'un type courant de cancer colique congénital (cancer colorectal non polypeux, ou HNPCC, une maladie des plus courantes, puisque une personne sur 200 en sera atteinte, ce qui correspond à environ 15 % de tous les cancers colorectaux aux USA). On découvrit le rapport entre HNPCC et la déficience à répa-

Figure 5.25
Réparation d'un mésappariement chez *E. coli*. Le système qui répare les mésappariements détecte la base inappropriée et l'excise dans le brin d'ADN néoformé, distingué du brin parental parce que non encore méthylé. MutS commence par se lier à la base mal placée, puis est rejointe par MutL. La liaison de celle-ci active MutH, qui coupe le brin normal en face d'un site de méthylation. Une hélicase et une exonucléase, associées à MutS et MutL, excisent alors la portion du brin non modifié qui contient le mésappariement. La lacune est ensuite comblée par l'ADN polymérase et la coupure scellée par la ligase.



MÉDECINE MOLÉCULAIRE



Cancer du colon et réparation d'ADN

Pathogénie

Le cancer du colon et du rectum (cancer colorectal) fait partie des types de cancer les plus courants dans les pays industrialisés, touchant près de 140 000 personnes au USA (près de 10 % de tous les cancers). La plupart des cancers colorectaux (comme beaucoup d'autres cancers) ne sont pas congénitaux, autrement dit ne se transmettent pas de parents à enfants, sauf dans deux types, où la transmission de gènes de susceptibilité au cancer augmente la probabilité d'apparition d'un cancer. Une forme de cancer colique congénital (la polypose adénomateuse familiale) est très rare puisqu'elle ne compte que pour moins de 1 % de tous les cancers du colon ; l'autre forme congénitale (le cancer colorectal familial sans polypose associée, ou HNPCC) est la plus commune des maladies congénitales puisqu'elle frappera près d'un individu sur 200. Quoique les cancers coliques soient la manifestation la plus habituelle de cette maladie, les patients atteints sont aussi sujets à une incidence plus élevée d'autres types de cancer, notamment de l'ovaire et de l'endomètre.

Bases moléculaire et cellulaire

Comme les autres cancers, le cancer colorectal est dû à des mutations de gènes qui ajustent la prolifération cellulaire, résultant en une multiplication anarchique des cellules touchées. Dans la plupart des cas, ces mutations apparaissent sporadiquement dans des cellules somatiques, mais dans les cancers congénitaux, des mutations transmises par la lignée germinale prédisposent le sujet à l'apparition d'un cancer. Une percée majeure eut lieu en 1993, quand on découvrit qu'un gène responsable d'environ 50 % des cas de HNPCC code un enzyme impliqué dans la réparation des mésappariements de l'ADN ; ce gène est un homologue humain du gène *MutS* de *E. coli*. Les travaux ultérieurs mirent en évidence trois autres gènes responsables des autres cas de HNPCC ; ce sont des homologues de *MutL*, donc des éléments de la voie qui répare les mésappariements apparus dans l'ADN. Les défauts de ces gènes provoqueraient de fréquentes mutations dans d'autres gènes cellulaires, d'où une grande probabilité que ces mutations de gène de réparation induisent des cancers *via* un dérèglement de la prolifération cellulaire.

Prévention et traitement

Comme il arrive pour les autres maladies congénitales, l'identification des gènes responsables de la HNPCC permet, grâce à des tests génétiques appropriés, d'identifier les sujets qui courent un risque élevé de développer un cancer congénital. En outre, le diagnostic génétique prénatal prend de l'importance pour les porteurs de mutations HNPCC qui envisagent de fonder une famille. Cependant, l'avantage de trouver ces porteurs de mutations ne se limite pas à empêcher la transmission des gènes mutés à la descendance, mais aussi à prévenir l'apparition d'un cancer chez les sujets menacés par leur héritage génétique.

En termes de prévention, un trait important du cancer colique est qu'il prend des années à s'installer ; si on le dépiste tôt, la chance de survie du patient est très bonne. Au premier stade, la maladie se limite à de petits polypes bénins, mais qui deviendront malins dès qu'ils envahiront le tissu conjonctif avoisinant ; avant d'en arriver là, le chirurgien peut obvier à leur cancérisation en en faisant l'exérèse. L'examen par coloscopie (un tube qui permet d'éclairer et d'observer la paroi du colon) des sujets prédisposés à la HNPCC décèle aisément les polypes et les premiers stades de cancérisation ; les lésions suspectes seront excisées avant qu'elles ne se cancérisent. En outre, certains médicaments susceptibles d'arrêter la cancérisation des lésions coliques sont à l'étude, laissant espérer un effet favorable chez les sujets atteints de HNPCC ; en permettant au médecin d'appliquer ces mesures préventives à temps, l'identification des mutations responsables de la HNPCC contribuera notablement à la prévention de cette maladie.



Polype du colon, vu par colonoscopie. (Custom Medical Stock Photo)

rer les mésappariements en 1993, lorsque deux groupes de chercheurs clonèrent l'homologue humain de *MutS* et prouvèrent que les mutations de ce gène pouvaient répondre de près de la moitié des cas de HNPCC. On montra ensuite que presque tous les autres cas de HNPCC sont dus à des mutations dans l'un des trois gènes humains homologues de *MutL*.

Réparation post-réplicative

Les systèmes de réparation agissant tant par renversement direct que par excision de nucléotide arrivent à rectifier les erreurs introduites dans l'ADN avant que celui-ci ne se réplique, de sorte que la synthèse réplicative d'ADN utilise comme brin matrice un brin d'ADN dépourvu d'erreurs. En cas de défaillance de ces systèmes, la cellule a recours à d'autres mécanismes pour rectifier l'ADN à la fourche de réplication. Comme les dimères de pyrimidine et bien d'autres types d'atteinte ne sont pas répliqués par l'action habituelle des ADN polymérases, la réplication s'arrête au niveau de ces anomalies ; cependant, en amont du site atteint, la réplication peut reprendre par la synthèse d'un fragment d'Okazaki et continuer le long d'un brin matrice atteint (figure 5.26). Il se forme alors un brin fils portant une lacune en face du site endommagé du brin parental. On connaît deux types de mécanisme capables de réparer une telle lacune dans un ADN néoformé, à savoir la réparation par recombinaison et la réparation sujette à erreur.

Le terme de **réparation par recombinaison** se justifie par le fait que le brin d'ADN parental resté intact s'est répliqué en donnant une molécule fille normale (voir figure 5.26). Le brin parental intact va servir de matrice pour combler la lacune située en face du site endommagé de l'autre molécule fille, *via* une recombinaison entre séquences d'ADN homologues (voir section sui-

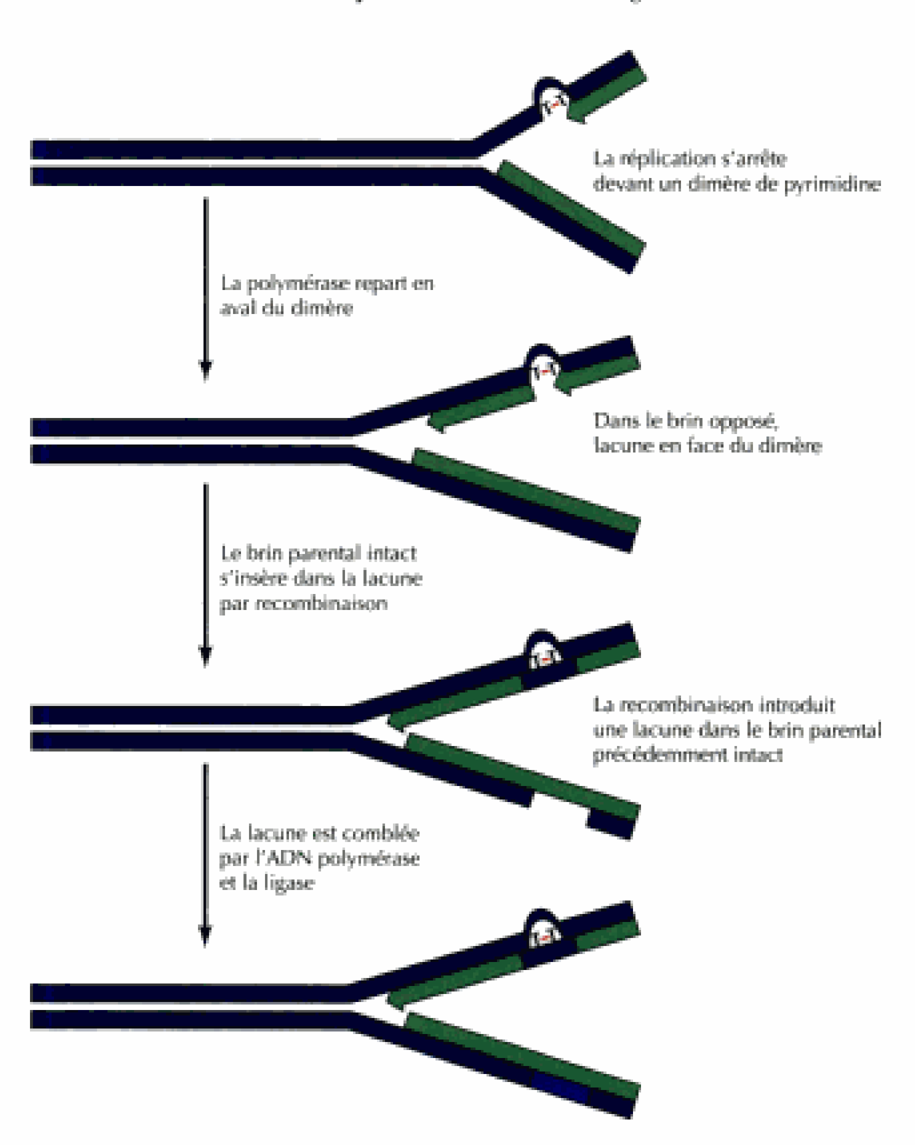


Figure 5.26
Réparation post-réplicative. La présence d'un dimère de thymine bloque la réplication, mais il arrive que l'ADN polymérase saute la lésion et reprenne la réplication en aval du dimère. En face du dimère, se forme ainsi une lacune dans le brin d'ADN néoformé. Au cours d'une réparation par recombinaison, cette lacune est comblée par recombinaison avec le brin parental indemne. Bien que cela laisse subsister une lacune dans le brin parental précédemment non touché, cette lacune sera comblée par action des polymérase et ligase qui utiliseront le brin fils-intact comme matrice. Il se forme donc deux molécules d'ADN intactes ; le dimère de thymine restant sera éliminé par le processus d'excision.

vante). Comme la lacune laissée sur le brin parental originellement intact fait face à un brin normal, elle va être comblée par l'ADN polymérase. Bien que l'autre molécule parentale ne soit pas débarrassée de la lésion d'origine (par exemple dimère de pyrimidine), cette lésion se trouve à présent en face d'un brin normal et fera l'objet plus tard d'une réparation par excision.

Dans une **réparation sujette à erreur**, toute lacune siégeant en face d'une séquence d'ADN endommagée va être comblée par un ADN néosynthétisé, mais comme ce dernier s'est répliqué sur un brin matrice endommagé, ce genre de synthèse est très imprécis et induit souvent des mutations. On ne le rencontre que chez les bactéries soumises à des conditions extérieures potentiellement létales, par exemple à un intense rayonnement UV. Ces traitements induisent une réponse SOS, qu'on peut considérer comme un mécanisme de prise en charge des stress environnementaux critiques. La réponse SOS comprend une inhibition de la division cellulaire et une induction des systèmes de réparation capables de remédier à des lésions importantes de l'ADN. Dans ces conditions, la cellule recourt à ses mécanismes de réponse sujets à erreur, seule alternative à sa propre destruction, causée par les lésions profondes dans l'ADN.

RECOMBINAISON ENTRE SÉQUENCES D'ADN HOMOLOGUES

Si une réplication précise et une réparation rigoureuse des lésions de l'ADN sont nécessaires au maintien de l'information génétique et à sa transmission sans faille d'une génération à la suivante, l'évolution exige cependant que la cellule soit capable de diversifier son génome. La diversité génétique entre individus est le point de départ principal de la sélection naturelle, qui rend les espèces capables d'évoluer et de s'adapter aux conditions mouvantes du milieu environnant. C'est ici qu'intervient de façon primordiale la recombinaison, puisqu'elle réassortit les gènes en donnant tout une variété de combinaisons. Une recombinaison génétique bien connue est, par exemple, l'échange de gènes qui advient entre chromosomes homologues lors de la méiose (voir figure 3.4). Les recombinaisons ne font cependant pas que d'accroître la diversité génétique ; comme on l'a montré à la section précédente, elles jouent aussi un rôle important en réparant les dommages subis par l'ADN. En outre, la recombinaison intervient dans des réarrangements de séquences d'ADN particulières, réarrangements qui modifient l'expression et la fonction de certains gènes pendant le développement de l'embryon et la différenciation des tissus. À part sa contribution à la diversification des espèces, la recombinaison joue donc plusieurs rôles importants dans la vie de telle cellule ou de tel organisme.

Cette section présente les mécanismes moléculaires qui recombinent des molécules d'ADN possédant de vastes homologies de séquence. On traitera de la recombinaison entre chromosomes d'eucaryotes appariés au moment de la méiose et de la recombinaison entre chromosomes lors de la conjugaison bactérienne. Comme ce type de recombinaison consiste en un échange d'information génétique entre deux molécules d'ADN homologues, il ne modifie pas la disposition globale des gènes sur le chromosome ; par contre, d'autres types de recombinaison se passent même à défaut d'une homologie de séquence étendue, autrement dit se produiront entre molécules d'ADN non apparentées. C'est ce type de recombinaison qui aboutit à des réarrangements de gènes, sujet qui nous occupera en fin de chapitre.

Les molécules d'ADN se recombinent par fracture et soudure

C'est chez la drosophile qu'on a d'abord décrit la recombinaison génétique, après avoir observé que des gènes siégeant sur les homologues d'une paire de chromosomes pouvaient se réassortir à l'occasion d'une méiose. Une fois confirmée l'idée que les gènes sont portés par l'ADN, deux modèles se pré-

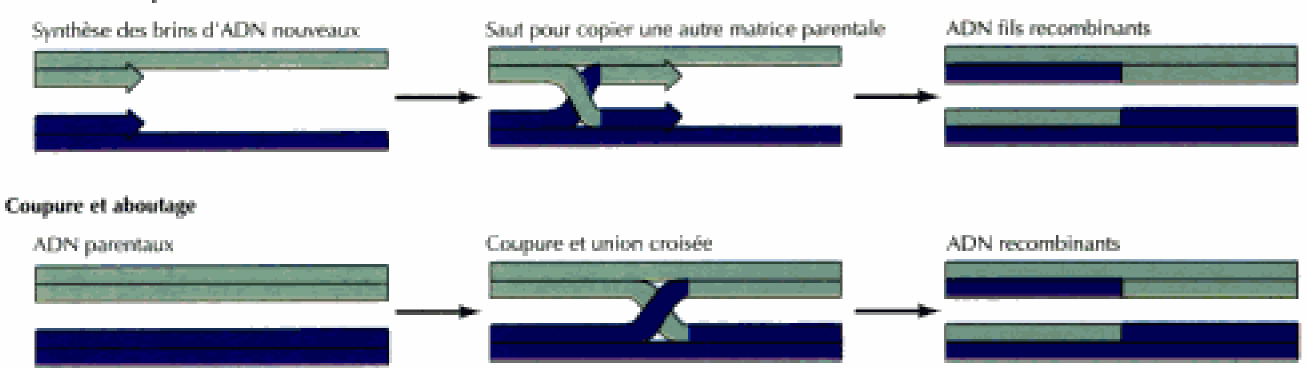


Figure 5.27
Modèles de recombinaison. Dans le « choix de l'exemplaire », la recombinaison a lieu durant la synthèse des molécules d'ADN filles. La réplication d'ADN démarre sur une matrice d'ADN parental, puis passe à une autre molécule parentale, pour donner des ADN fils recombinants portant des séquences homologues à celles des deux parents. Dans le modèle de coupure et aboutage, la recombinaison résulte d'une rupture suivie de réunion des molécules d'ADN parentales.

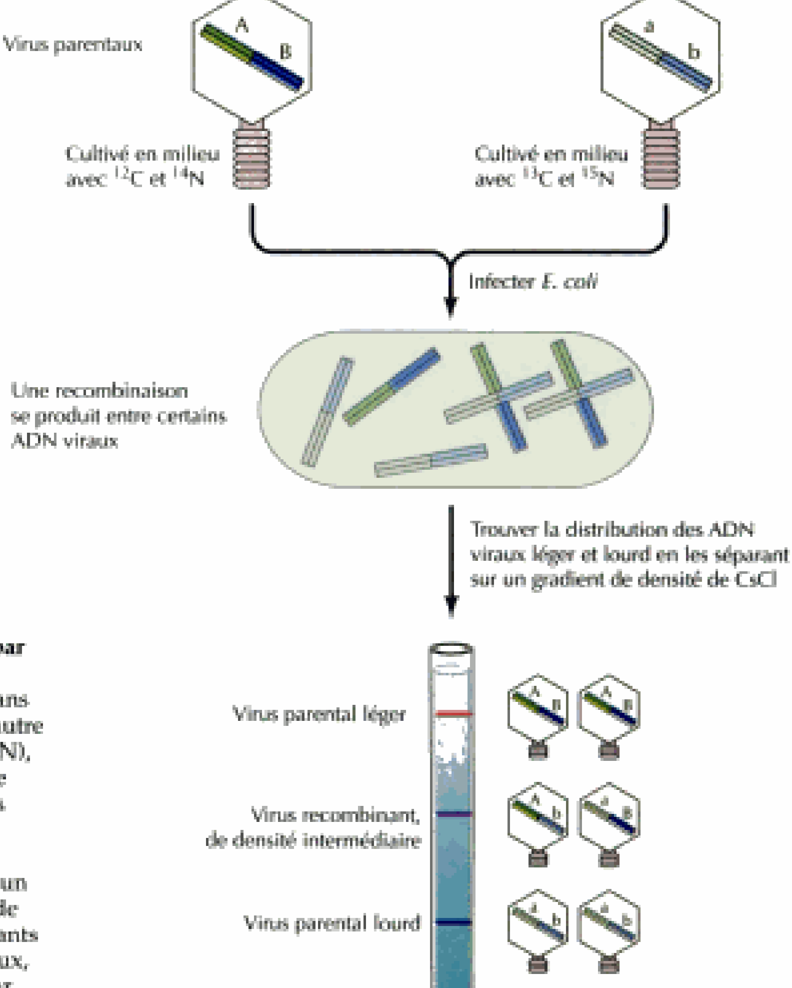


Figure 5.28
Démonstration expérimentale d'une recombinaison par coupure et aboutage. On fait pousser deux souches parentales de virus génétiquement différentes, l'une dans un milieu contenant des isotopes légers (^{12}C et ^{14}N), l'autre dans un milieu contenant des isotopes lourds (^{13}C et ^{15}N), de façon à obtenir un marquage par densité. On infecte ensuite, avec un échantillon des deux cultures, d'autres bactéries *E. coli* dans des conditions où les virus ne se répliquent pas. On récolte la descendance virale et on examine son ADN en le centrifugeant à l'équilibre sur un gradient de CsCl qui sépare par flottaison les variétés de virus de l'extrait. On s'aperçoit que les virus recombinants ont une densité intermédiaire à celle des virus parentaux, preuve qu'ils ont reçu l'ADN de leurs deux parents, par coupure et aboutage.

sentaient, capables d'expliquer la recombinaison au plan moléculaire (figure 5.27) : le « choix de l'exemplaire » proposait que la molécule recombinée provenait de ce que la machinerie de synthèse d'ADN, après avoir répliqué un ADN parental, passait sur une autre matrice ; l'autre modèle postulait que la recombinaison était due à la rupture de deux molécules parentales, suivie de raboutage des morceaux plutôt que d'une synthèse nouvelle d'ADN.

On put faire un choix entre ces deux propositions quand on se mit à étudier, en 1961, la recombinaison entre génomes de virus bactériens (figure 5.28). On savait qu'en infectant *E.* coli avec des virus portant divers marqueurs génétiques on obtenait une descendance recombinante. Afin de découvrir si cette recombinaison impliquait une coupure avec ressoudure des ADN parentaux, on cultiva l'un des virus parentaux dans un milieu pourvu des éléments lourds du carbone (^{13}C) et de l'azote (^{15}N) et l'autre virus dans un milieu constitué des isotopes légers, normaux, de ces atomes (^{12}C et ^{14}N), de façon à obtenir des virus parentaux de densité différente, qu'on pouvait séparer par centrifugation dans un gradient de densité constitué de CsCl. On infecta alors une même culture de *E. coli* avec ces deux types de virus (lourd et léger), dans des conditions telles que le virus ne se répliquait pas. En examinant la densité et les traits génétiques des virus produits par la culture bactérienne, on remarqua que les recombinants génétiques viraux avaient une densité intermédiaire, preuve qu'ils avaient reçu l'ADN de leurs deux parents, comme le prédit le modèle de « coupure-ressoudure » mais non le modèle du « choix de l'exemplaire ».

Modèles du mécanisme de recombinaison entre homologues

En constatant que la recombinaison met en jeu une coupure suivie de rescellement, on soulevait une difficulté majeure : comment deux molécules d'ADN homologues pouvaient-elles être scindées au même endroit de leur séquence avec une précision telle qu'elles soient rescellées sans entraîner de mutation par départ ou apport de nucléotides au site de coupure ? Quand deux molécules d'ADN homologues se recombinent (**recombinaison homologue générale**), on doit s'attendre à ce que l'alignement nécessaire provienne d'un appariement de bases entre brins complémentaires (figure 5.29) ; les brins monocaténaires débordants passent d'une molécule d'ADN à son homologue en formant une région hétéroduplexe dont chacun des brins de l'hélice double recombinée provient d'un chromosome d'hérédité différente. Toute différence génétique dans cette région hétéroduplexe produira une molécule fille d'ADN unique, pourvue de deux marqueurs génétiques. Certaines bases mésappariées de l'hétéroduplex sont parfois reconnues et corrigées par les systèmes réparant les mésappariements, comme on l'a montré dans les sections précédentes de ce chapitre. Basé sur des études de recombinaison chez les champignons et les bactéries, des arguments génétiques en faveur de la formation et de la correction de ces régions hétéroduplexes ont conduit dès 1964 à l'adoption du **modèle** moléculaire **de Holliday** (conçu par Robin Holliday) ; ce modèle est resté la base de tout concept expliquant les mécanismes de recombinaison, bien que des données récentes l'aient quelque peu modifié.

La version première du modèle de Holliday proposait qu'une recombinaison commence par des coupures en un endroit donné de l'un des brins

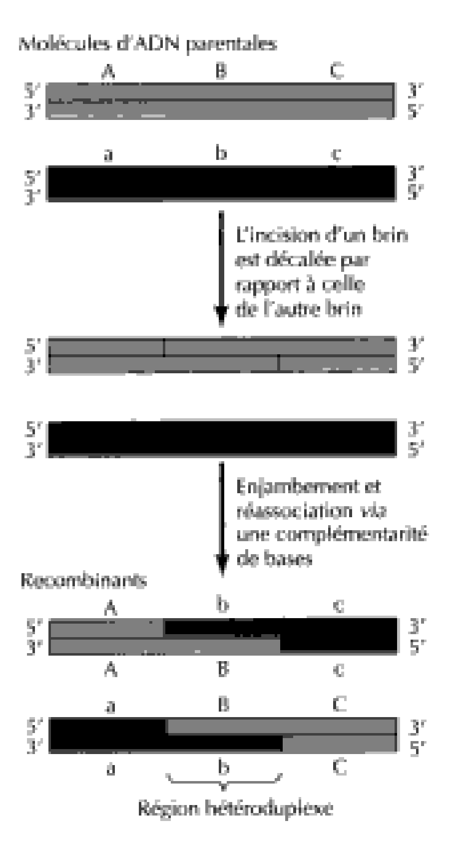


Figure 5.29
Recombinaison entre homologues par appariement de bases complémentaires. Les brins de deux ADN parentaux sont incisés en des endroits décalés et les régions monocaténaires en saillie s'échangent par appariement de bases avec les séquences homologues. On obtient une région hétéroduplexe dont les deux brins proviennent de molécules parentales différentes.

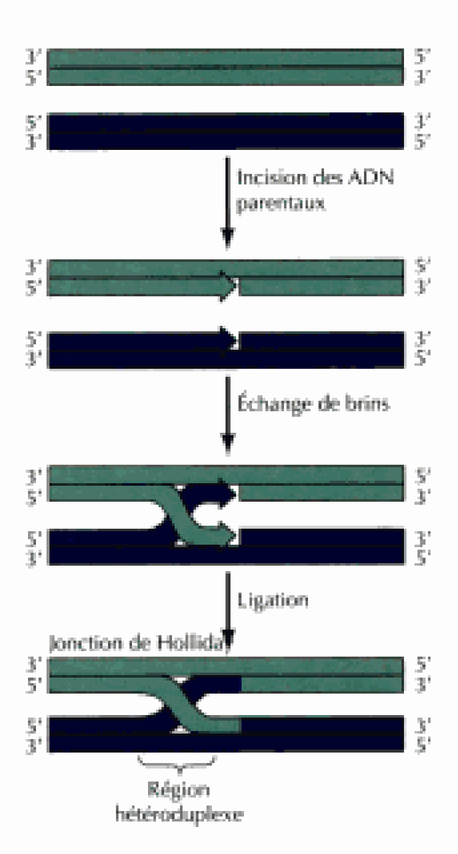


Figure 5.30
Modèle de recombinaison entre homologues selon Holliday. Les deux molécules concernées subissent, dans un de leurs brins, une incision en position identique dans les deux molécules parentes. Les deux brins coupés s'échangent ensuite par appariement de bases complémentaires, puis la ligation produit un intermédiaire à brins croisés, qu'on appelle jonction de Holliday.

correspondants de deux molécules d'ADN (figure 5.30) ; les brins d'ADN coupés se détordent sur une certaine longueur et chacun envahit réciproquement l'autre molécule en s'appariant au brin complémentaire non incisé. La soudure des brins incisés donne alors un intermédiaire à brins croisés, dit **jonction de Holliday**, en fait, le nœud du processus de recombinaison ; la preuve concrète de ce modèle tient dans l'observation directe de jonctions de Holliday au microscope électronique (figure 5.31).

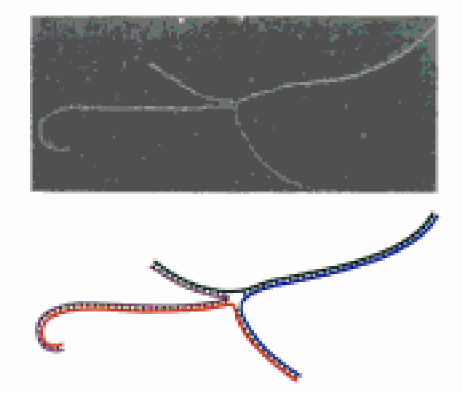
Une fois formée, une jonction de Holliday peut se résoudre par scission et rescellement des brins croisés, pour donner des molécules recombinantes (figure 5.32). Cela se passe de deux façons, selon l'orientation de la jonction de Holliday, qui donnent naissance à deux isomères. Dans l'isomère issu de l'échange initial de brins, les brins croisés sont ceux qui ont été coupés tout au début du processus de recombinaison, mais il suffit d'une rotation de cette structure pour obtenir l'autre isomère, dans lequel ce sont les brins parentaux non coupés qui se croisent. La résolution de ces isomères a des conséquences génétiques propres à chacun d'eux : dans le premier cas, les molécules filles comportent une région hétéroduplexe, mais ne sont pas recombinantes dans les séquences qui bordent la région hétéroduplexe ; par contre, dès que l'isomérisation se produit, la coupure puis le rescellement des brins croisés produit des molécules filles qui sont, elles, recombinantes dans les séquences bordant la région hétéroduplexe. La structure de la jonction de Holliday rend donc possible la génération d'hétéroduplexes tant recombinants que non recombinants, en accord avec les observations génétiques sur lesquelles repose le modèle de Holliday.

En 1975, on a revu le modèle de Holliday, pour résoudre une incertitude dans sa formulation originelle, à savoir qu'on avait admis sans preuve qu'au départ d'une recombinaison les deux molécules parentales étaient coupées simultanément au même endroit. Dans la version nouvelle, la recombinaison commence dès qu'une seule des molécules parentales est coupée (figure 5.33) ; le brin coupé s'écarte alors et sa chaîne monocaténaire envahit l'autre molécule parentale par appariement de bases homologues, en formant une boucle d'ADN connexe qui sera coupée et ressoudée à l'autre molécule parentale. On obtient ainsi une jonction de Holliday à brins croisés, susceptible de se résoudre, comme on vient de le montrer, en molécules hétéroduplexes recombinantes ou non recombinantes.

Une autre correction apportée encore au modèle de Holliday propose que la recombinaison s'amorce par coupure non d'un seul brin, mais des deux brins d'une molécule ; au site de coupure, les exonucléases préparent alors des queues monocaténaires prêtes à envahir une molécule bicaténaire homologue. Ceci mène encore à une jonction de Holliday, qui sera résolue en deux hétéroduplexes, recombinants ou non recombinants. Le modèle qui rend compte de cette coupure bicaténaire s'applique particulièrement bien à la recombinaison méiotique des levures.

Pour expliquer l'amorçage de la recombinaison entre deux molécules d'ADN, on peut donc choisir entre plusieurs mécanismes, mais on n'en connaît pas encore bien certains détails, particulièrement chez les eucaryotes. Malgré cela, il reste que la jonction à brins croisés de Holliday, générant une région hétéroduplexe par échange de brins, est la clé de voûte du processus de recombinaison.

Figure 5.31
Identification d'une jonction de Holliday au microscope électronique.
Jonction de Holliday vue au microscope électronique dans une cellule de *E. coli* au moment de la recombinaison de molécules d'ADN plasmidien. On a dessiné un calque en dessous de la photographie. La figure illustre une jonction de Holliday dans la configuration ouverte due à une rotation des intermédiaires à brins croisés. (Aimablement communiqué par Huntington Potter et David Dressler, Harvard Medical School)



Jonction de Holliday au départ
A B a b
Tourner la moitié inférieure de 180°
A B b a
Tourner la moitié droite de 180°
Isomère de la jonction de Holliday
A a b B
Inciser et souder les brins croisés
A B a b
A B + a b
Hétéroduplex non recombinants
Inciser et souder les brins croisés
A a b B
A b + a B
Hétéroduplex recombinants

Figure 5.32
Isomérisation et résolution d'une jonction de Holliday. Une jonction de Holliday se résout par coupure et rescellement des brins croisés. Quand se résout la jonction de Holliday formée par l'échange de brins initial, les molécules filles sont des hétéroduplex mais ne sont pas recombinantes pour des marqueurs génétiques placés en dehors de la zone hétéroduplexe. Il suffit néanmoins de deux rotations dans la molécule à brins croisés pour obtenir un isomère dans lequel ce sont non pas les brins déjà coupés, mais bien les brins parentaux intacts qui se croisent. En coupant et ressoudant les brins croisés de cet isomère, on obtient des descendants qui sont des hétéroduplex recombinés.

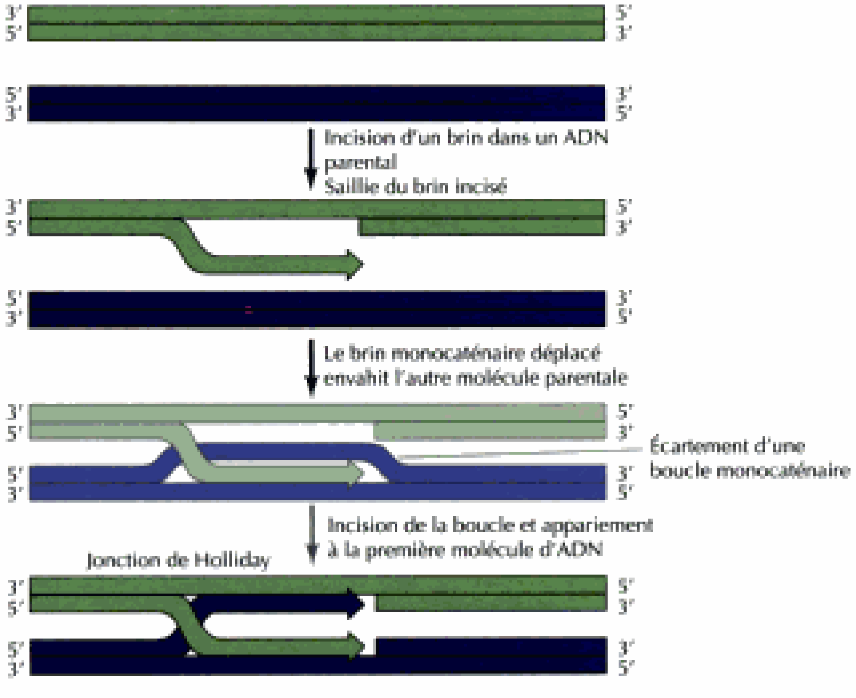


Figure 5.33
Recombinaison amorcée par incision de l'une seulement des molécules parentales. Le brin d'ADN coupé envahit la molécule apparentée par appariement de bases homologues et expulse une boucle d'ADN monocaténaire. Après avoir été coupée, cette boucle s'apparie à la première molécule parentale pour former une jonction de Holliday à brins croisés.

Enzymes en jeu dans la recombinaison homologue

La plupart des enzymes en jeu dans le processus de recombinaison ont été découverts par l'examen de mutants de *E. coli* défectifs pour la recombinaison. Ce type d'analyse génétique a établi qu'une recombinaison requiert ses propres enzymes, à côté de certaines protéines (comme l'ADN polymérase, l'ADN ligase et les protéines se fixant à l'ADN monocaténaire) qui exercent leur action en divers points du métabolisme de l'ADN. En identifiant les gènes qui garantissent une recombinaison efficace chez *E. coli*, on a pu isoler les protéines codées par ces gènes et les caractériser biochimiquement *in vitro* ; aussi connaît-on plusieurs enzymes qui catalysent la formation et la résolution des jonctions de Hollyday.

La protéine clé active dans la recombinaison d'homologues est **RecA** ; elle effectue l'échange de brins entre ADN homologues, en formant des hétéroduplexes (figure 5.34). RecA agit en trois étapes : d'abord, elle se fixe au brin monocaténaire d'ADN, en le tapissant pour former un filament protéine-

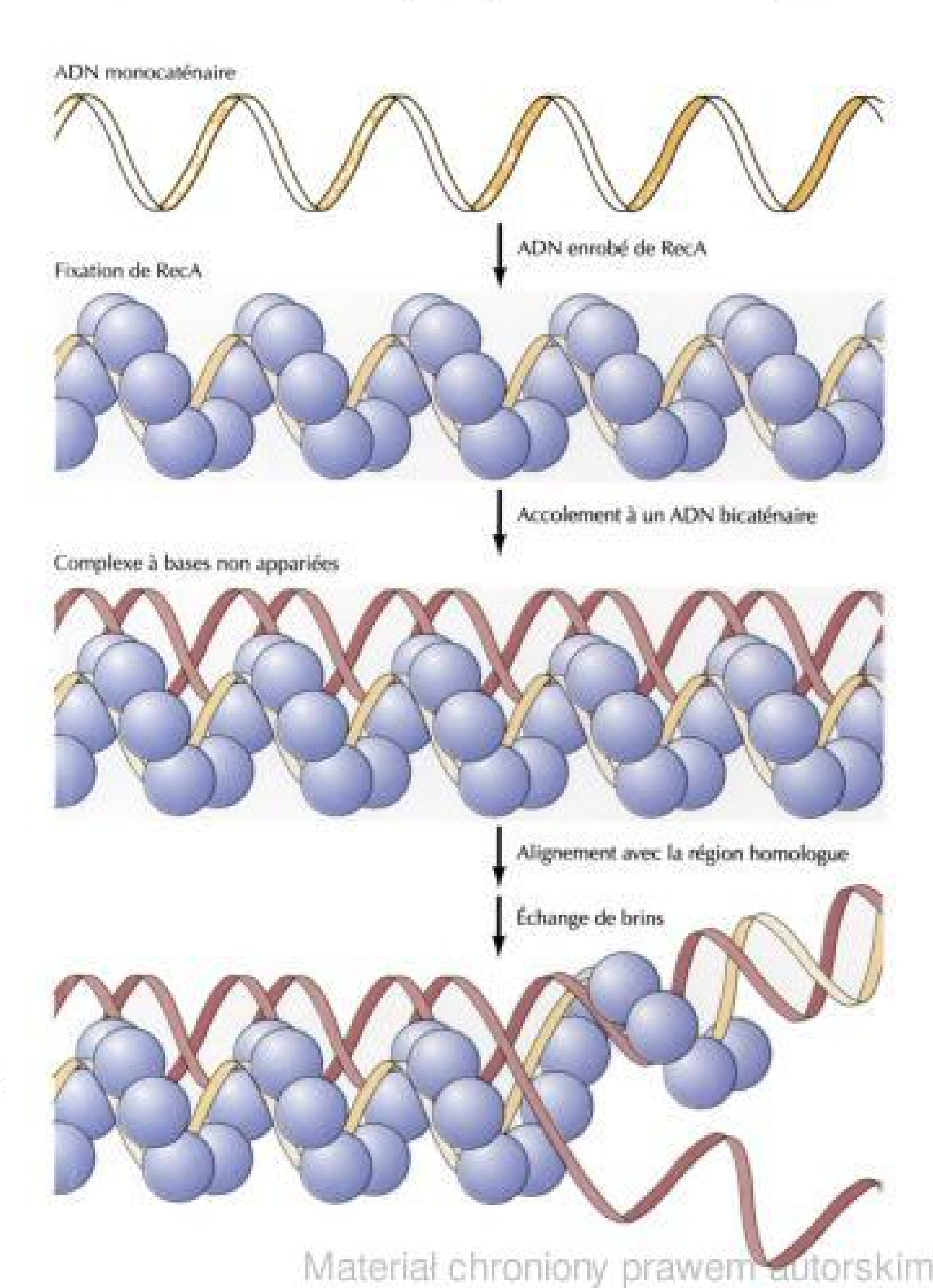


Figure 5.34
Rôle de la protéine RecA. RecA commence par se fixer à un ADN monocaténaire, pour former un filament hybride protéine-ADN. La protéine RecA qui enrobe l'ADN monocaténaire s'accole ensuite à une autre molécule d'ADN, bicaténaire, en formant un complexe à bases non appariées. Puis les bases complémentaires s'apparient et les brins s'échangent pour former une région hétéroduplexe.

ADN. Comme RecA porte deux sites affins envers l'ADN, toute protéine RecA ancrée à un brin monocaténaire a tendance à se fixer à une autre molécule, bicaténaire, d'ADN, pour constituer un pont entre deux molécules. Cette association non spécifique dirigée par RecA est suivie par un appariement de l'ADN monocaténaire avec son complément. Ensuite, la protéine RecA catalyse un échange de brins, le brin monocaténaire déjà enrobé de RecA venant prendre la place de son homologue pour former un hétéroduplex. La protéine RecA peut donc, à elle seule, catalyser la réaction d'échange de brins, celle qui est au cœur de la formation des jonctions de Holliday.

La protéine RAD51 de la levure, le pendant de RecA, est nécessaire à la recombinaison génétique et à la réparation des incisions bicaténaires ; RAD51 est non seulement apparentée structurellement à RecA, elle est aussi capable de catalyser les réactions d'échange de brins *in vitro*. Comme on a retrouvé des protéines apparentées RAD51 chez les eucaryotes supérieurs, notamment chez l'Homme, on est sûr que les protéines apparentées à RecA jouent un rôle critique dans la recombinaison entre homologues tant dans les cellules de procaryotes que dans celles d'eucaryotes.

Chez *E. coli*, la plupart des événements recombinatoires ne se passent pas en l'absence de l'enzyme RecBCD, un complexe de trois protéines, RecA, B et C. Les propriétés de RecBCD s'accordent avec l'hypothèse selon laquelle il amorce la recombinaison en formant l'ADN monocaténaire auquel RecA va se fixer. Le rôle de RecBCD est ici de détordre et de couper l'ADN bicaténaire (figure 5.35). Le complexe RecBCD s'attache au bout d'une molécule d'ADN et agit en tant que hélicase, détordant l'ADN temporairement à mesure qu'il progresse le long de la molécule. Quand il rencontre une

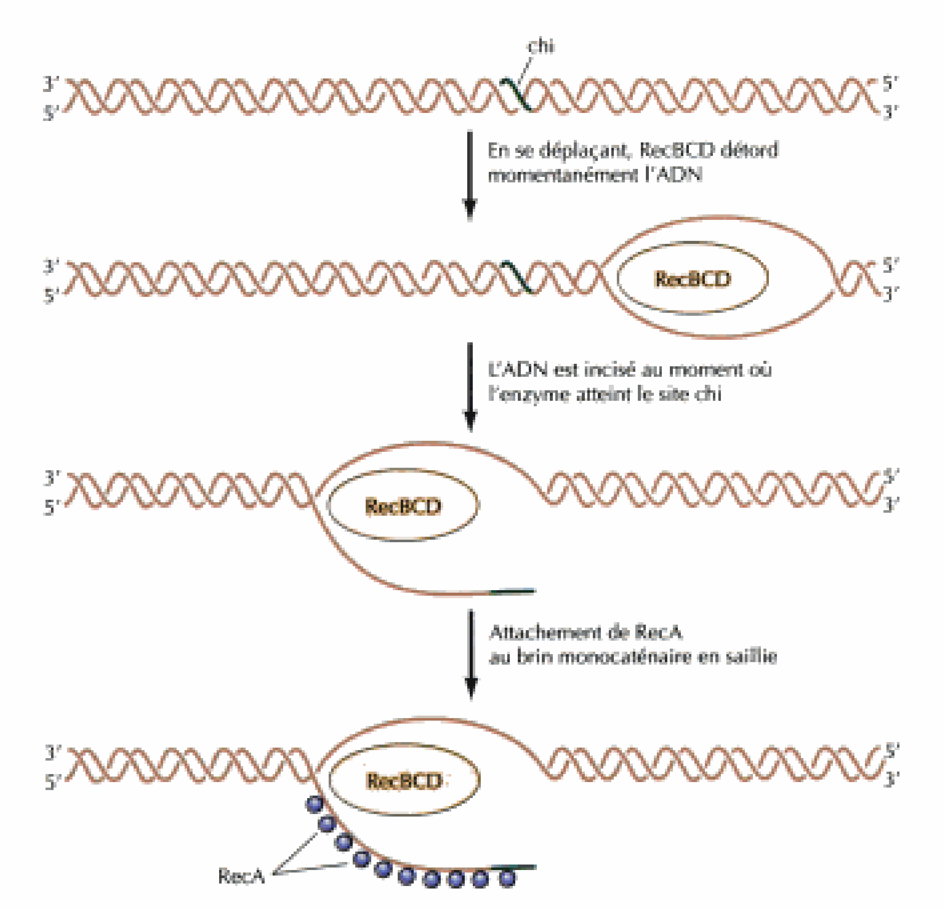


Figure 5.35
Amorçage d'une recombinaison par RecBCD. Le complexe RecBCD de *E. coli* s'attache au bout d'une molécule d'ADN et détord l'hélice au fur et à mesure qu'il avance. Dès qu'il rencontre une séquence particulière (appelée site chi), il incise le brin d'ADN qui la porte ; la détorsion s'étend et repousse une boucle monocaténaire à laquelle se fixe RecA.

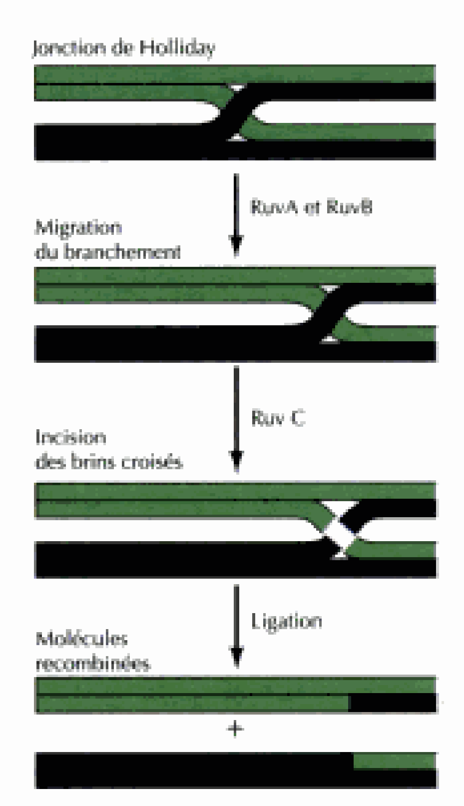


Figure 5.36
Migration de branchement et résolution d'une jonction de Holliday. Deux protéines de *E. coli* (RuvA et RuvB) catalysent de concert le déplacement du site à brins croisés d'une jonction de Holliday (migration de branchement). RuvC résout la jonction de Holliday en incisant les brins croisés, qui seront ensuite unis par la ligase.

séquence nucléotidique singulière (GCTGGTGG, appelée site chi), RecBCD agit en tant que nucléase et coupe un des brins. Il continue alors à détordre l'hélice double, en formant un brin monocaténaire déplacé auquel RecA ira se fixer pour amorcer un échange de brins.

Une fois la jonction de Holliday formée, trois autres protéines de *E. coli*, RuvA, B et C interviennent dans la recombinaison (figure 5.36). RuvA et RuvB forcent de concert la migration du site au niveau duquel les brins de la jonction de Holliday se croisent ; ceci fait varier la longueur de la région hétéroduplexe et la position à laquelle les brins croisés seront incisés puis ressoudés. La protéine RuvC résout ensuite la jonction de Holliday, par incision des brins d'ADN croisés.

Chez la levure, les jonctions de Holliday sont résolues par un complexe protéique formé de RAD1 et RAD10 ; RAD1 coupe les brins monocaténaires d'ADN au niveau du croisement des brins. RAD1 et RAD10 sont les homologues des protéines de réparation XPF et ERCC1 de mammifère et incisent aussi l'ADN endommagé au cours d'une réparation par excision de nucléotides (voir tableau 5.1). Les homologues de RAD1 et RAD10 joueraient donc un rôle constant dans la recombinaison à travers toute la série des eucaryotes.

RÉARRANGEMENTS DE L'ADN

Toute recombinaison entre homologues réassortit les gènes entre éléments d'une paire de chromosomes, sans changer la place des gènes dans le génome, mais il est des types d'événements recombinatoires qui entraînent des remaniements de l'ADN génomique. Certains de ces réarrangements ont une grande influence sur la commande de l'expression génétique dans certains types cellulaires, d'autres jouent un rôle dans l'évolution s'ils contribuent à la diversité génétique.

Le fait que des gènes puissent passer d'un site chromosomique à un autre fut découvert chez le maïs dans les années '40 par Barbara McClintock ; en se basant sur un examen exclusivement génétique, elle décrivit de nouveaux éléments génétiques capables d'occuper diverses positions dans le génome en modifiant l'expression de gènes contigus. Il fallut attendre presque trois décennies pour découvrir la raison physique des observations de McClintock, et ce grâce à la découverte des éléments bactériens transposables, et le même laps de temps pour que les biologistes acceptent l'idée de l'existence d'éléments génétiques mobiles. On connaît à présent plusieurs types de réarrangement d'ADN chez les procaryotes et les eucaryotes, y compris la transposition des éléments découverts par McClintock.

Recombinaison propre à un site

Contrairement à la recombinaison générale entre homologues, qui se passe entre grands tronçons de séquences homologues, la **recombinaison propre à un site** a lieu entre séquences d'ADN particulières dont l'homologie ne porte habituellement que sur une petite région d'ADN. L'interaction majeure qui gouverne ce processus est due à des protéines qui reconnaissent des séquences cibles d'ADN singulières et non à un appariement de bases complémentaires.

Le prototype d'une recombinaison propre à un site dérive de travaux sur le bactériophage λ. Quand λ infecte *E. coli*, soit il s'y réplique en entraînant la lyse de la cellule, soit il s'intègre au chromosome bactérien en formant un

prophage qui se transmet comme une partie intégrante du génome de *E. coli* (un processus appelé **lysogénie**)(figure 5.37). Dans certaines conditions, son intégration à l'ADN prend fin par excision de l'ADN de λ et amorçage de la réplication lytique du virus. Intégration et excision de l'ADN de λ se produisent *via* une recombinaison propre à un site entre des séquences d'ADN viral et cellulaire.

L'ADN de *E. coli* et celui de λ se recombinent en des sites particuliers, appelés sites d'attache (*att*) ; l'intégration de l'ADN de λ met donc en jeu

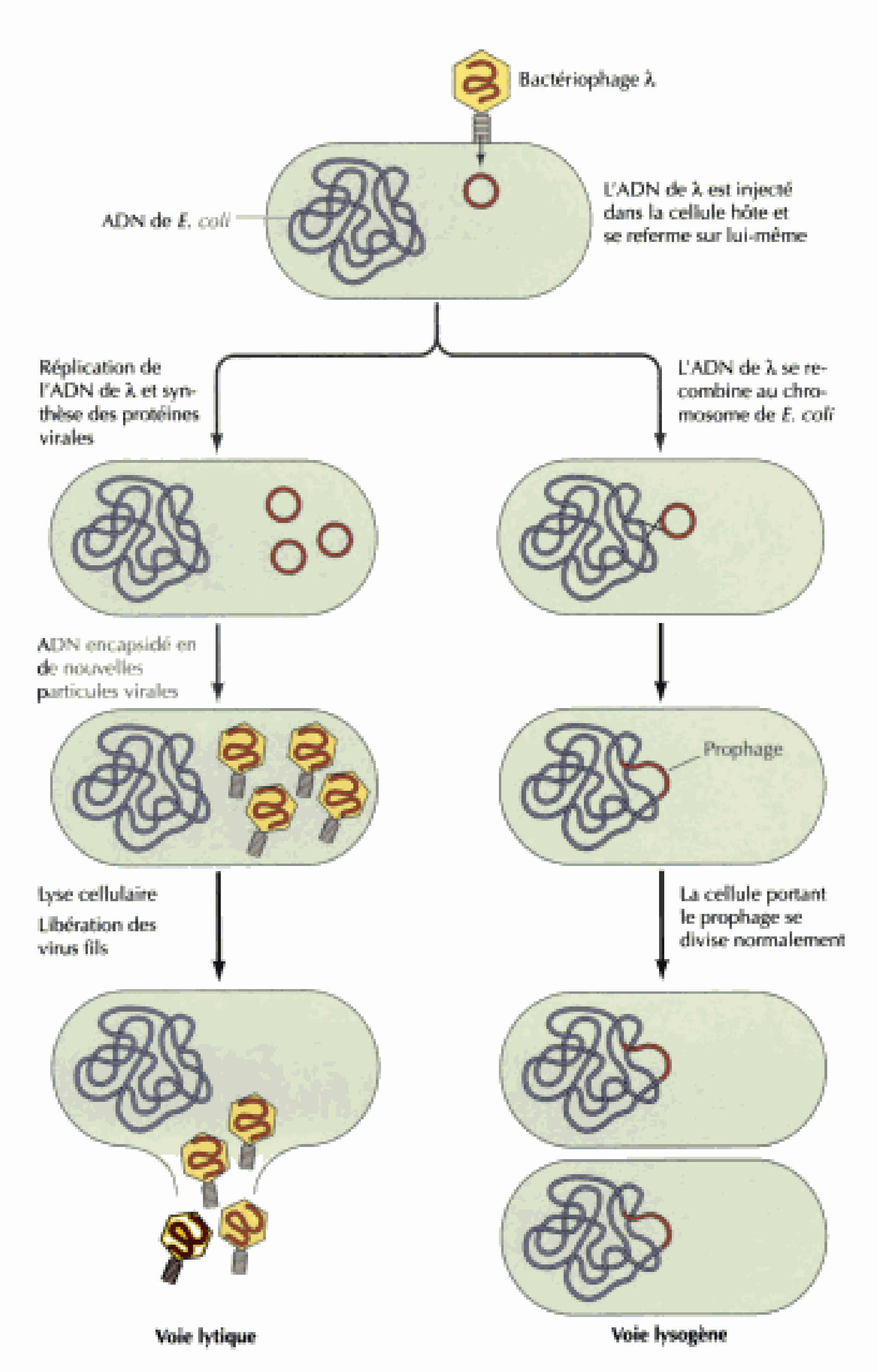


Figure 5.37
Voies lytique et lysogène du bactériophage λ. L'infection de *E. coli* commence par l'injection de l'ADN de λ, qui se referme sur lui-même dans la cellule hôte. Dans l'infection de type lytique, l'ADN de λ se réplique et commande la synthèse des protéines virales. L'ADN viral est ensuite encapsidé pour donner des particules filles, libérées au moment de la lyse de la cellule hôte. Dans l'infection de type lysogène, l'ADN de λ se recombine au génome de l'hôte en donnant un prophage, intégré au chromosome de *E. coli*. Une fois intégré, l'ADN de λ ne dirige aucune expression de virions, mais se réplique avec le reste du génome bactérien.

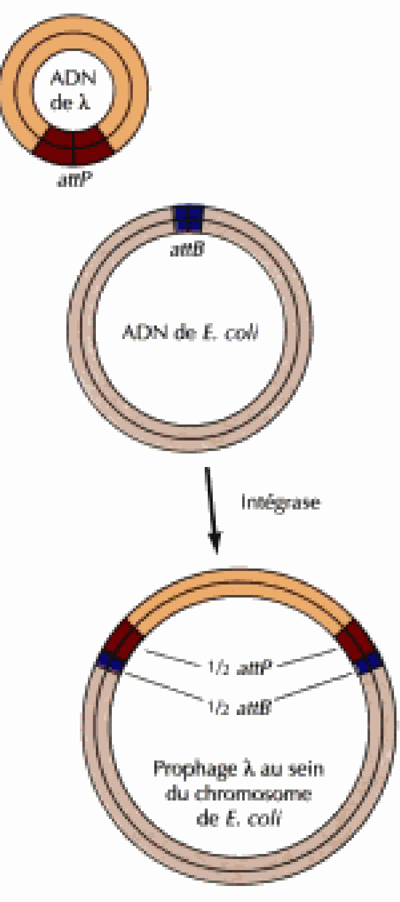


Figure 5.38
Intégration de l'ADN de λ par recombinaison propre à un site. L'intégration est due à une recombinaison entre des séquences particulières des génomes de λ et de *E. coli* appelées respectivement *attP* et *attB*. Le processus est catalysé par un enzyme codé par le virus (l'intégrase), qui reconnaît à la fois les séquences de *attP* et de *attB*.

une recombinaison entre des sites du phage (*attP*) et des sites bactériens (*attB*), d'une longueur respective d'environ 240 et 25 nucléotides (figure 5.38). Ce processus s'accomplit grâce à une protéine de λ appelée intégrase (Int), qui s'attache spécifiquement aux séquences des sites *attP* et *attB* ; Int se fixe d'abord à *attP* en formant un complexe dans lequel l'ADN *attP* s'enroule autour d'un paquet de molécules de Int ; le complexe Int-*attP* recrute ensuite *attB*, en alignant les sites *att* du phage sur ceux de la bactérie. Phage et bactérie échangent alors leurs brins sur la longueur de la séquence de 15 nucléotides commune aux sites *attB* et *attP* (figure 5.39). La protéine Int effectue des incisions décalées au sein de la région d'homologie de ces deux sites,

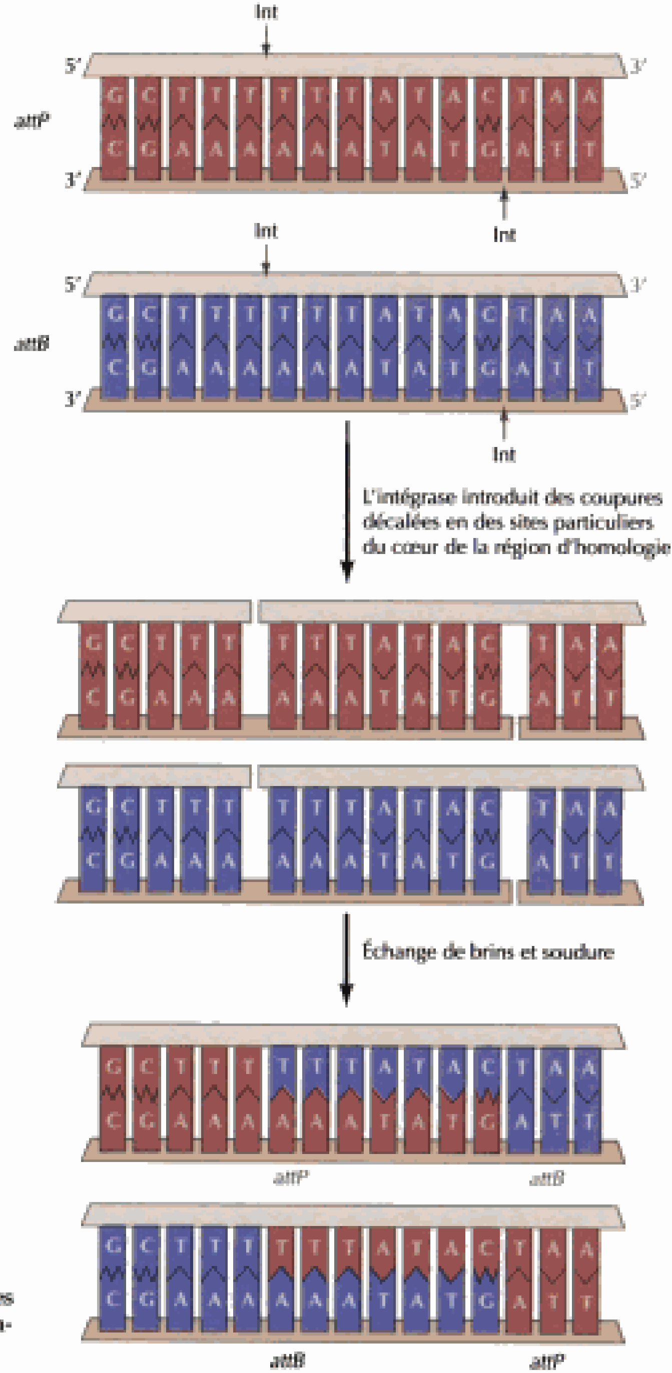


Figure 5.39
Mécanisme, chez λ, de la recombinaison propre à un site. Une recombinaison propre à un site se produit dans un noyau de séquence de 15 nucléotides que partagent *attP* et *attB*. L'intégrase (Int) coupe en des endroits singuliers de cette séquence et génère des queues monocaténaires collantes d'ADN. Elle catalyse ensuite un échange de brins et une ligation, ce qui recombine *attP* et *attB* et intègre l'ADN de λ.

catalyse un échange de brins, puis, par la soudure des extrémités, achève d'intégrer l'ADN de λ au chromosome de *E. coli*. La protéine Int catalyse aussi l'excision du prophage λ, par un processus inverse de l'intégration.

La recombinaison propre à un site n'est pas seulement importante dans l'interaction d'un virus, comme λ, avec sa cellule hôte, mais aussi au cours de réarrangements programmés de gènes des génomes cellulaires. Chez les vertébrés, ce type de recombinaison est capital pour la maturation du système immunitaire, celui qui reconnaît les substances étrangères (**antigènes**) et dresse une barrière contre les agents infectieux. Il existe deux classes de réponses immunitaires, dont se chargent respectivement les lymphocytes B et T. Les lymphocytes B sécrètent les anticorps (**immunoglobulines**), qui réagissent avec les antigènes, tandis que les lymphocytes T expriment à leur surface des protéines (les **récepteurs portés par les cellules T**) qui réagissent avec les antigènes exprimés à la surface d'autres cellules. Le trait commun aux antigènes et aux récepteurs portés par les lymphocytes T est leur vaste diversité, qui permet à l'éventail des molécules d'anticorps et de récepteurs T de reconnaître une panoplie d'antigènes étrangers. Chacun de nous est ainsi capable de produire plus de 10^{11} sortes d'anticorps différents, soit bien plus que le nombre total de gènes composant le génome humain (environ 10^5). À défaut d'être codé dans l'ADN de la lignée germinale, ces divers anticorps (et récepteurs T) sont codés par des gènes lymphocytaires uniques formés pendant la maturation du système immunitaire, grâce à une recombinaison propre à un site entre fragments particuliers des gènes d'immunoglobulines ou des gènes de récepteurs des cellules T.

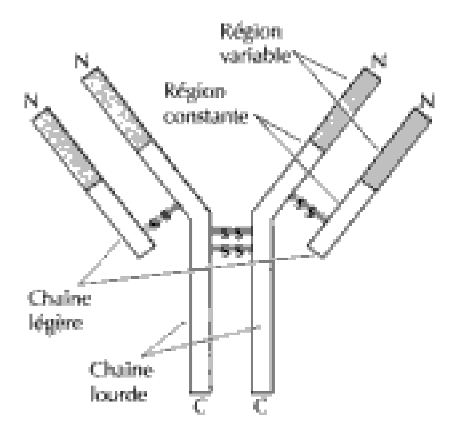


Figure 5.40
Structure d'une immunoglobuline. Une molécule d'immunoglobuline se compose de deux chaînes lourdes et de deux chaînes légères, unies par des ponts disulfure. Les deux types de chaînes comportent une région variable et une région constante.

C'est Susumu Tonegawa qui, en 1976, prouva le rôle joué par la recombinaison propre à un site dans la génération d'immunoglobulines. Une immunoglobuline est constituée d'une paire de chaînes polypeptidiques lourdes identiques et d'une paire de chaînes polypeptidiques légères identiques (figure 5.40). Chaînes lourde et légère comprennent une région C-terminale constante et une région N-terminale variable ; à celle-ci, faite de séquence d'acides aminés propres à chaque molécule d'immunoglobuline, est due la fixation d'un antigène, et la diversité des séquences d'acides aminés des régions variables fait que chaque anticorps reconnaît un antigène unique. Bien que chacun de nous produise un éventail très étendu d'anticorps, chacun de nos lymphocytes B ne produit qu'un seul type d'anticorps. L'avancée majeure de Tonegawa fut de montrer que chaque anticorps est codé par un gène qui s'est formé par recombinaison propre à un site lors de la maturation du lymphocyte B. Ces réarrangements de gène génèrent des gènes d'immunoglobuline propres à chaque lymphocyte B, de sorte que la population des quelque 10^{12} lymphocytes B de notre corps contient un nombre de cellules suffisant pour livrer des anticorps contre une panoplie d'antigènes étrangers.

Les gènes qui codent les chaînes lourdes d'immunoglobulines comportent trois régions : V code les 95 ou 96 acides aminés N-terminaux de la région variable du polypeptide, J, la jonction, code les 12 à 14 résidus constituant la partie C-terminale de la région variable du polypeptide et la région C code la région constante du polypeptide (figure 5.41). Chez la souris, la classe principale de gènes de chaîne légère provient de la combinaison d'environ 250 régions V à 4 régions J et à une seule région C. La recombinaison propre à un site qui se produit lors de la maturation du lymphocyte aboutit à un réarrangement de gène par lequel une région V unique se joint à une région J unique pour donner une chaîne légère fonctionnelle. Comme chaque lymphocyte B subit un réarrangement particulier de ses régions V et J, la combinaison potentielle des 250 variantes V aux quatre régions J peut donner naissance à environ 1 000 chaînes légères singulières.

Les chaînes lourdes comportent en sus une quatrième région (la région de diversification, ou région D), qui code les résidus d'acide aminé situés

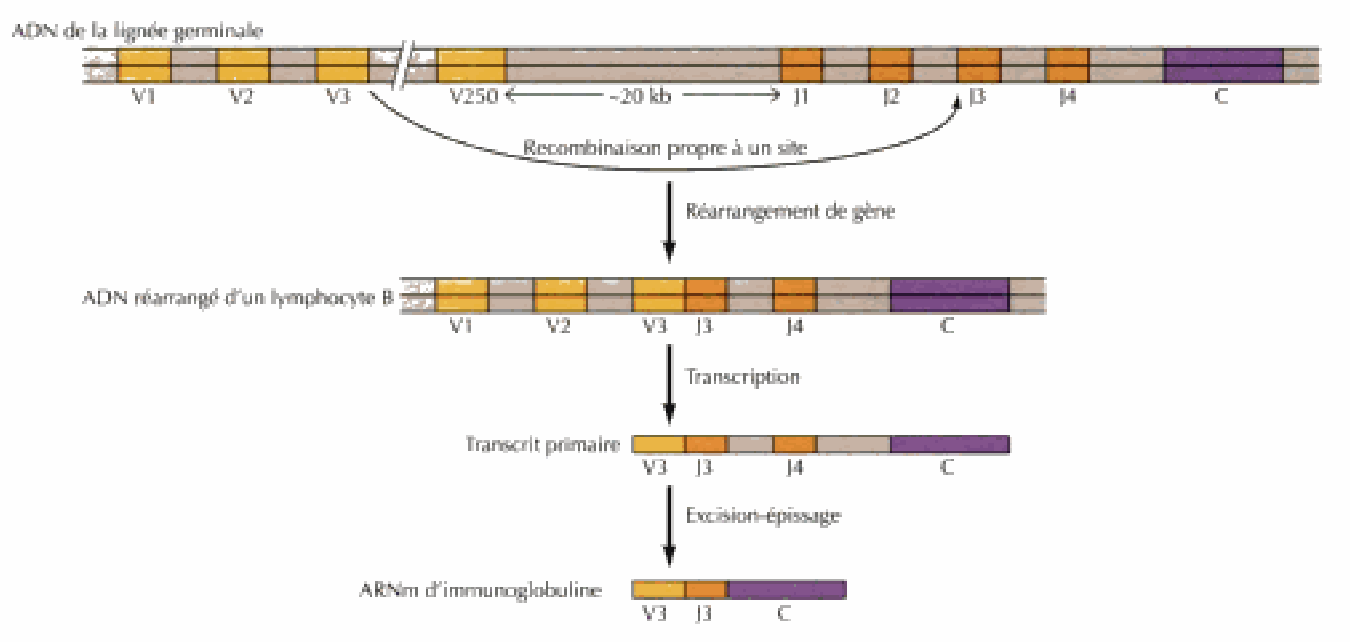


Figure 5.41
Réarrangement d'un gène de chaîne légère d'immunoglobuline. Chaque gène de chaîne légère (ici, la chaîne légère κ de souris) comporte une région constante (C), une région de jonction (J) et une région variable (V). Il existe environ 250 espèces de régions V, séparées des régions J et C par près de 20 kb dans l'ADN de la lignée germinale. Lors de la maturation du lymphocyte B, une recombinaison propre à un site unit une des régions V à l'une des quatre régions J. Ce réarrangement met en route la transcription, donnant un transcrit primaire formé d'une région réorganisée VJ couplé au reste des régions J et C. Les autres régions J et les introns situés entre J et C sont ensuite éliminés par excision-épissage, pour donner un ARNm prêt à être traduit.

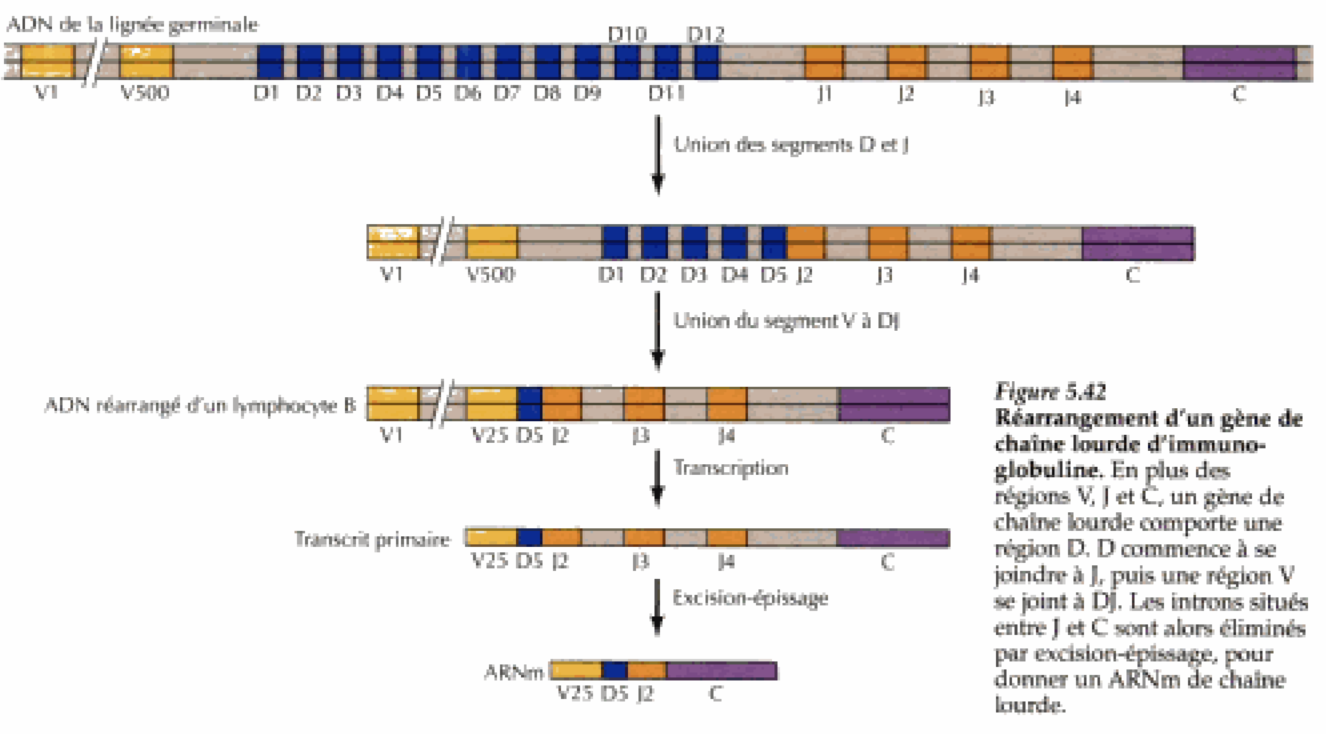


Figure 5.42
Réarrangement d'un gène de chaîne lourde d'immunoglobuline. En plus des régions V, J et C, un gène de chaîne lourde comporte une région D. D commence à se joindre à J, puis une région V se joint à DJ. Les introns situés entre J et C sont alors éliminés par excision-épissage, pour donner un ARNm de chaîne lourde.

entre V et J (figure 5.42). L'élaboration d'un gène de chaîne lourde fonctionnelle requiert deux événements recombinatoires : une région D se recombine d'abord à une région J, puis une région V se recombine au segment réorganisé DJ ; comme il existe, chez la souris, près de 500 régions V, 12 régions D et 4 régions J de chaîne lourde, le nombre total de gènes de chaîne lourde obtenus par recombinaison atteint 24 000 (500 x 12 x 4).

La combinaison des 1 000 types de chaînes légères aux 24.000 types de chaînes lourdes obtenu par recombinaison spécifique d'un site génère ainsi 2 x 10^7 molécules d'immunoglobulines différentes. Cette diversité s'accroît encore du fait que la réunion des segments de gène n'est pas toujours précise, un petit nombre de nucléotides étant perdus ou gagnés au site de jonction. Les mutations qui en résultent augmentent la diversité des régions variables des immunoglobulines d'environ 100 fois, pour donner 10^5 types de chaînes légères et 2 x 10^6 types de chaînes lourdes ; leur combinaison dans la molécule quadrimère d'immunoglobuline livre à l'organisme plus de 10^{11} types de molécules d'anticorps. Après cette réorganisation des gènes d'anticorps, la marge de diversification s'élargit encore par un processus appelé hypermutation somatique, dû à ce que de fréquentes mutations apparaissent dans les régions variables des chaînes lourdes et des chaînes légères.

Les récepteurs portés par les cellules T comportent deux chaînes (α et β), constituées toutes deux d'une région variable et d'une région constante (figure 5.43). Les gènes qui codent ces polypeptides se forment par recombinaison de séquences V et J (chaîne α) et de segments V, D et J (chaîne β), comme cela se passe dans la formation des gènes d'anticorps. En sus des mutations subies pendant la recombinaison, la recombinaison propre à un site entre ces divers fragments d'ADN confère aux gènes de récepteurs T un degré de diversité semblable à celui des immunoglobulines. Néanmoins, les gènes des récepteurs portés par la cellule T diffèrent de ceux des immunoglobulines en ceci que leur diversification échappe au phénomène d'hypermutation somatique.

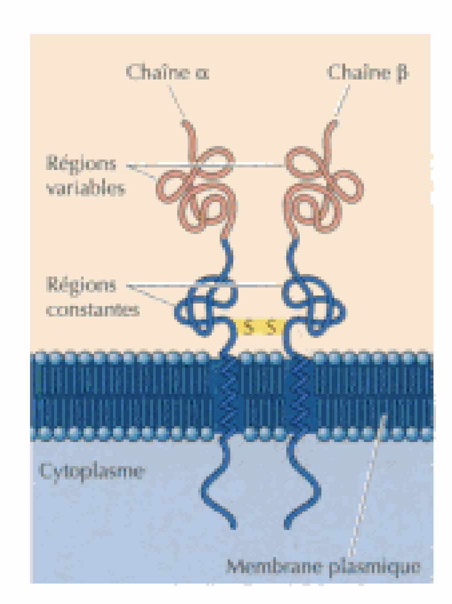


Figure 5.43
Structure d'un récepteur à la surface d'une cellule T. Ce récepteur se compose de deux chaînes polypeptidiques (α et β) qui traversent la membrane et sont unies par des liaisons disulfure. Les chaînes α et β comportent toutes deux une région variable et une région constante.

Transposition via un intermédiaire d'ADN

Alors que la recombinaison propre à un site avait lieu entre séquences singulières comportant au moins un petit noyau d'homologie, une **transposition** implique un déplacement de séquences n'importe où dans le génome, sans le concours d'une homologie de séquence. On appelle **éléments transposables**, ou **transposons**, des fragments d'ADN du genre de ceux décrits par McClintock, qui se déplacent par transposition ; ils sont de deux types, selon qu'ils se transposent *via* un intermédiaire d'ADN ou *via* un intermédiaire d'ARN. Voyons d'abord ceux du premier type ; nous décrirons ceux du deuxième type dans la section suivante.

Les transposons les mieux connus sont ceux des bactéries ; ils se déplacent *via* des intermédiaires d'ADN (figure 5.44). Parmi ces éléments, les plus simples sont les séquences d'insertion, qui s'étendent sur environ 800 à 2 000

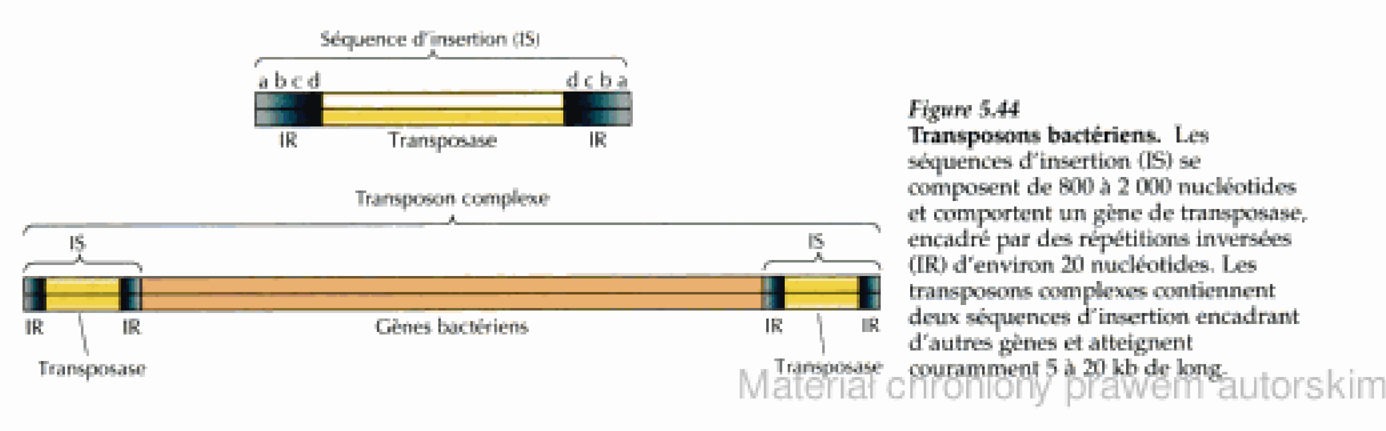


Figure 5.44
Transposons bactériens. Les séquences d'insertion (IS) se composent de 800 à 2 000 nucléotides et comportent un gène de transposase, encadré par des répétitions inversées (IR) d'environ 20 nucléotides. Les transposons complexes contiennent deux séquences d'insertion encadrant d'autres gènes et atteignent couramment 5 à 20 kb de long.

EXPÉRIENCE CLÉ



Réarrangement des gènes d'immunoglobulines

Preuve d'un réarrangement somatique de gènes d'immunoglobulines codant des régions variables et constantes

Nobumichi Hozumi et Susumu Tonegawa
Basel Institute for Immunology, Basel, Switzerland

Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, Volume 73, 1976, pages 3628-3632

Contexte

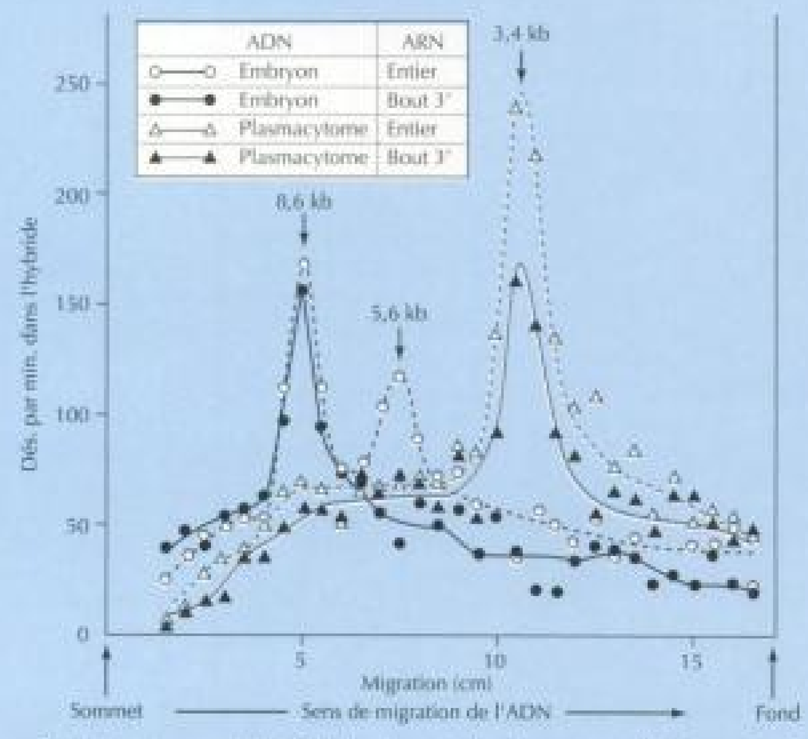
Puisque le système immunitaire d'un vertébré reconnaît une variété apparemment infinie de molécules étrangères, on doit admettre que ses lymphocytes sécrètent un éventail correspondant, immense, d'anticorps. Comme cette diversité des anticorps est la condition sine qua non de la reconnaissance immunitaire, la clef de voûte de l'immunologie est de saisir comment les diverses immunoglobulines, apparemment en nombre illimité, sont codés dans l'ADN génomique.

Avant les travaux de Hozumi et Tonegawa, le séquençage des chaînes de diverses immunoglobulines avait indiqué que tant leurs chaînes légères que leurs chaînes lourdes comportent une région variable et une région constante. Des études ultérieures de génétique montraient que la souris n'hérite qu'un seul exemplaire des gènes codant la région constante. De ces observations, on proposa d'abord que les immunoglobulines sont codées par un grand nombre de gènes des régions variables, chacun se liant à un gène unique de région constante. La découverte du réarrangement des gènes d'immunoglobulines par Hozumi et Tonegawa fournit le premier argument expérimental en faveur de cette hypothèse, ainsi que la trame nécessaire pour saisir la base moléculaire de la diversité des anticorps.

Preuve expérimentale

Hozumi et Tonegawa voulaient savoir si les gènes codant les régions variables et constantes d'une immunoglobuline s'unissaient au niveau de la molécule d'ADN pendant la maturation du lymphocyte. Leur approche consistait d'abord à digérer d'une part l'ADN d'un embryon de souris, d'autre part l'ADN d'un plasmacytome de souris (une tumeur lymphocytaire qui ne produit qu'une sorte d'immunoglobuline) puis de comparer l'organisation des séquences des régions variables et des régions constantes de ces deux échantillons. On digéra ces deux échantillons par l'endonucléase de restriction *Bam*HI et on sépara les fragments obtenus par une électrophorèse en gel d'agarose ; le gel fut partagé en tranches et l'ADN extrait des tranches hybridé avec des sondes radioactives préparées à partir des ARNm d'immunoglobulines isolés des cellules du plasmocytome ; les auteurs utilisèrent deux espèces de sondes, l'une comprenant l'ARNm entier, l'autre la moitié 3' de cet ARNm, composé seulement de la région constante.

On observa des profils totalement différents pour l'embryon et le plasmocytome quant aux séquences d'ADN (voir figure) des régions variables et constantes. Dans l'ADN embryonnaire, la grande sonde s'hybridait à deux fragments *Bam*HI d'environ 8,6 et 5,6 kb, alors que la



Électrophorèse en gel des ADN d'embryon et de plasmocytome digérés par *Bam*HI et hybridés aux sondes correspondant soit à la molécule entière d'ARNm du plasmocytome, soit à son bout 3'. On a mesuré ici la radioactivité qui s'est hybridée à l'ADN de chaque tranche de gel.

Réarrangement des gènes d'immoglobulines (suite)

sonde 3' ne s'hybridait qu'au fragment de 8,6 kb, suggérant que le fragment de 5,6 kb contenait les séquences de la région constante et le fragment de 8,6 kb celles de la région variable. Par contre, dans l'ADN du plasmocytome, les deux sondes ne s'hybridaient qu'à un seul fragment, de 3,4 kb. Les auteurs interprétèrent ces résultats comme ceci : les séquences des régions variable et constante, séparées dans l'ADN embryonnaire, s'étaient réarrangées en un gène d'immunoglobuline unique durant la maturation du lymphocyte.

Portée de la découverte

Basés sur une approche assez indirecte, à savoir une cartographie de fragments de restriction, les résultats initiaux de Hozumi et Tonegawa furent confirmés et s'étoffèrent grâce au clonage moléculaire et au séquençage des gènes d'immunoglobuline. Ces travaux ont établi définitivement que ces gènes se forment par recombinaison propre à un site entre divers tronçons d'ADN chez les lymphocytes B. Chez les lymphocytes T, de semblables réarrangements d'ADN assemblent les gènes codant les récepteurs placés à la surface des lymphocytes T. La maturation du système immunitaire dépend donc étroitement de recombinaisons propres à un site et de réarrangements programmés de gènes.

Les études ultérieures ont montré que les régions variables des immunoglobulines et des récepteurs T proviennent de réarrangements de deux ou trois segments distincts de la molécule d'ADN ; leur capacité à se recombiner et la grande fréquence des mutations introduites au site de recombinaison contribuent notablement à diversifier les anticorps et les récepteurs T. La découverte des réarrangements des gènes d'immunoglobulines nous a permis enfin de saisir comment le système immunitaire reconnaît un nombre pratiquement illimité de substances étrangères et nous défend contre elles.


Susumu Tonegawa

nucléotides. Ces séquences ne comportent qu'un gène, celui qui code l'enzyme en jeu dans la transposition (transposase), flanqué de deux petites répétitions inversées qui sont les sites où la transposase exerce son action. Les transposons complexes comprennent deux séquences d'insertion encadrant d'autres gènes, qui se déplacent d'un bloc.

Toute séquence d'insertion passe d'un site chromosomique à un autre sans répliquer son ADN (figure 5.45) ; la transposase effectue une incision avec décalage dans l'ADN cible et incise aux bouts des séquences répétitives inversées du transposon. Bien que la transposase agisse de façon spécifique envers les répétitions inversées du transposon, ce n'est pas le cas envers la séquence de l'ADN cible : c'est pourquoi elle catalyse la migration des transposons n'importe où dans le génome. L'ADN du transposon et l'ADN cible une fois incisés, la transposase aboute les bouts collants de l'ADN cible aux extrémités de l'élément transposable ; la lacune ainsi formée dans l'ADN du site cible sera réparée par une synthèse d'ADN, puis par soudure à l'autre brin du transposon. Ce processus génère une courte répétition directe dans l'ADN du site cible à chaque bout de l'élément transposable–signature de l'intégration d'un transposon.

Ce mécanisme de transposition fait passer un transposon d'un site chromosomique à un autre. D'autres transposons migrent par un mécanisme plus complexe dans lequel le transposon se réplique en même temps qu'il s'intègre en un nouveau site cible ; de ce fait, un exemplaire du transposon s'intègre à un nouvel endroit du génome en même temps qu'un autre exemplaire continue d'occuper la position initiale.

Les transposons qui se déplacent *via* un intermédiaire d'ADN sont présents chez les bactéries et les eucaryotes. Les premiers éléments transposables décrits par McClintock chez le maïs se déplacent par un mécanisme non réplicatif, comme le font certains éléments transposables de *Drosophila* et d'autres insectes ; à l'égal de la plupart des transposons bactériens, ces éléments vont occuper des sites cibles à des endroits quelconques du génome. Si le déplacement en lui-même de ces transposons ne paraît pas utile à la cellule dans laquelle il se produit, les mutations induites par le déplacement du transposon joueraient un rôle important dans l'évolution des espèces.

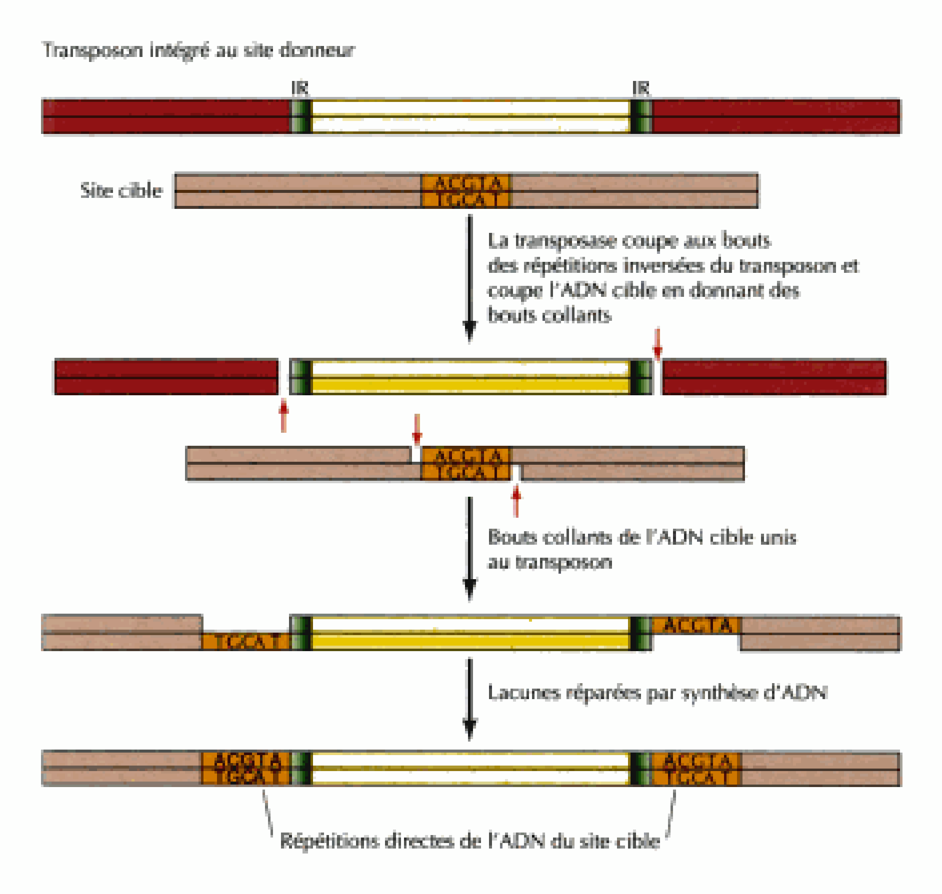


Figure 5.45
Transposition de séquences d'insertion. Une transposition simple se passe sans que l'ADN du transposon se réplique. La transposase coupe aux deux bouts du transposon et introduit deux incisions décalées dans l'ADN cible. Les bouts collants de l'ADN cible sont alors soudés au transposon et les lacunes dues aux bouts en saillie du site cible sont réparées. De chaque côté du transposon intégré, il se forme ainsi de courtes répétitions directes de l'ADN du site cible (de 5 à 10 nucléotides de long).

Cependant, chez la levure et les protozoaires, la transposition par un mécanisme réplicatif cause des réarrangements d'ADN programmés qui ajustent l'expression de certains gènes ; dans ce cas, la transposition commence par l'intervention d'une nucléase spécifique qui coupe un site cible particulier, là où va s'insérer une copie de l'élément transposable. Un élément transposable peut donc non seulement migrer en un site quelconque du génome, mais aussi prendre part à un réarrangement sélectif de gène qui commandera une reprogrammation de l'expression génétique.

Transposition via un intermédiaire constitué d'ARN

La plupart des transposons de cellule eucaryotique se déplacent *via* un intermédiaire d'ARN et non d'ADN, par un mécanisme qui rappelle la réplication des rétrovirus, ceux-là même qui ont servi de prototype pour l'étude de cette catégorie de séquences d'ADN mobiles.

Un **rétrovirus** comporte, sous forme de particule virale, un génome d'ARN, mais il se réplique *via* la synthèse d'un ADN proviral qui s'intègre à l'ADN chromosomique de la cellule infectée (voir figure 3.15). Une copie ADN de l'ARN viral est synthétisée par l'enzyme nommé **transcriptase inverse**. Le mécanisme ainsi en jeu aboutit à la synthèse d'une molécule d'ADN pourvue de répétitions directes de plusieurs centaines de nucléotides à ses deux bouts (figure 5.46). Ces séquences répétitives, appelées **longues répétitions terminales** ou **LTR**, proviennent de la duplication des sites de l'ARN viral sur lesquels s'accolent les amorces servant à répliquer l'ADN. Outre leur rôle dans l'intégration et la transcription ultérieure de l'ADN proviral, les séquences LTR tiennent une place importante dans la transcription inverse.

À l'égal de toutes les ADN polymérases, la transcriptase inverse exige une amorce qui, dans le cas d'un rétrovirus, est une molécule d'ARNt arrimée

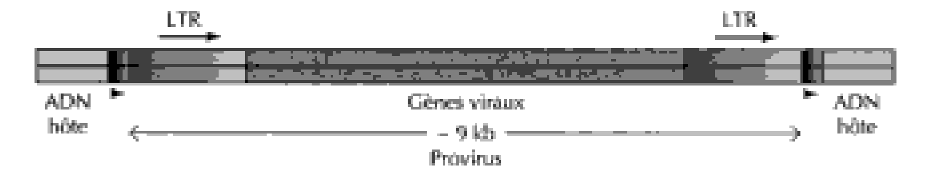


Figure 5.46
Disposition d'un ADN rétroviral. L'ADN proviral intégré est encadré par deux longues répétitions terminales (LTR), qui ne sont rien d'autre qu'une suite de blocs de quelques centaines de nucléotides. Entre ces LTR, se trouvent les gènes viraux, dont celui de la transcriptase inverse et ceux des protéines de structure de la particule virale. Le provirus intégré est flanqué de courtes répétitions sens unique de l'ADN hôte.

en un site particulier (site de fixation de l'amorce) voisin du bout 5′ de l'ARN viral (figure 5.47). Comme la synthèse d'ADN avance de 5′ en 3′, seul un petit segment d'ADN s'est formé quand la transcriptase inverse atteint l'extrémité de l'amorce ; la synthèse d'ADN reprend ensuite dès que l'enzyme « saute » à l'extrémité 3′ de la molécule d'ARN qui sert de matrice. Cet enzyme le peut grâce à son activité d'ARNase H qui hydrolyse le brin ARN de l'hybride ADN-ARN. Aussi, l'ADN néosynthétisé est-il converti en une molécule monocaténaire qui s'hybride à la courte séquence répétitive portée par les bouts 5′ et 3′ de l'ARN viral. La synthèse du brin d'ADN complémentaire débute sur le fragment d'ARN viral, qui sert d'amorce, situé près du bout 3′ du brin matrice d'ADN ; de nouveau se forme un petit fragment d'ADN comprenant le site de fixation de l'amorce copié sur l'ARNt utilisé comme première amorce par la transcriptase inverse. Quand la séquence d'ARNt liée à l'amorce a été dégradée par l'ARNase H, il reste un brin d'ADN saillant qui cherche à s'apparier à la séquence qui lui est complémentaire à l'autre bout de la matrice. La synthèse d'ADN progresse donc à nouveau pour donner enfin une molécule d'ADN ouverte pourvue de LTR à ses deux bouts.

Cet ADN viral ouvert s'intègre dans le chromosome de la cellule hôte *via* un processus qui rappelle l'intégration d'un élément d'ADN transposable ; l'intégration est catalysée par une protéine d'intégration virale et atteint des séquences cible quelconques de l'ADN cellulaire. La protéine d'intégration élimine 2 nucléotides à chaque bouts de l'ADN viral et effectue des incisons décalées dans le site cible de l'ADN nucléaire. Les bouts collants de l'ADN cellulaire s'apparient ensuite aux bouts de l'ADN viral et la lacune se comble par synthèse d'ADN. Une fois intégré, le provirus siège entre deux répétitions directes de séquences cellulaires, semblables à celles qui bordent les transposons d'ADN.

Le cycle biologique du virus se poursuit par la transcription du provirus intégré, étape qui reconstitue tant l'ARN génomique viral que les ARNm dirigeant la synthèse des protéines virales (y compris la transcriptase inverse et la protéine d'intégration). L'ARN génomique est ensuite encapsidé en formant des particules virales qui seront libérées par la cellule hôte ; ces particules peuvent infecter une autre cellule et amorcer un nouveau cycle de synthèse et d'intégration d'ADN. On admet qu'on a globalement affaire à la migration d'un provirus d'un site chromosomique à un autre, *via* la synthèse et la transcription inverse d'un intermédiaire ARN.

On peut considérer un rétrovirus comme un type de **rétrotransposon,** c'est-à-dire un élément qui se déplace par ARN interposé. Certains autres transposons diffèrent des rétrovirus en ceci qu'ils ne s'encapsident pas sous forme de particule infectieuse et, de ce fait, ne passent pas d'une cellule à ses voisines, mais cela ne les empêche pas de changer de site chromosomique à l'intérieur d'une même cellule, grâce à des mécanismes semblables à ceux mis en jeu dans la réplication d'un rétrovirus.

La structure de certains rétrotransposons (dits de classe I) rappelle celle des rétrovirus (figure 5.48) ; on l'a étudiée chez la levure, la drosophile, la souris et les plantes. Les rétrotransposons de ce type portent des séquences LTR à chaque bout, codent une transcriptase inverse et une protéine d'intégration, changent de place (comme un rétrovirus) *via* une transcription en

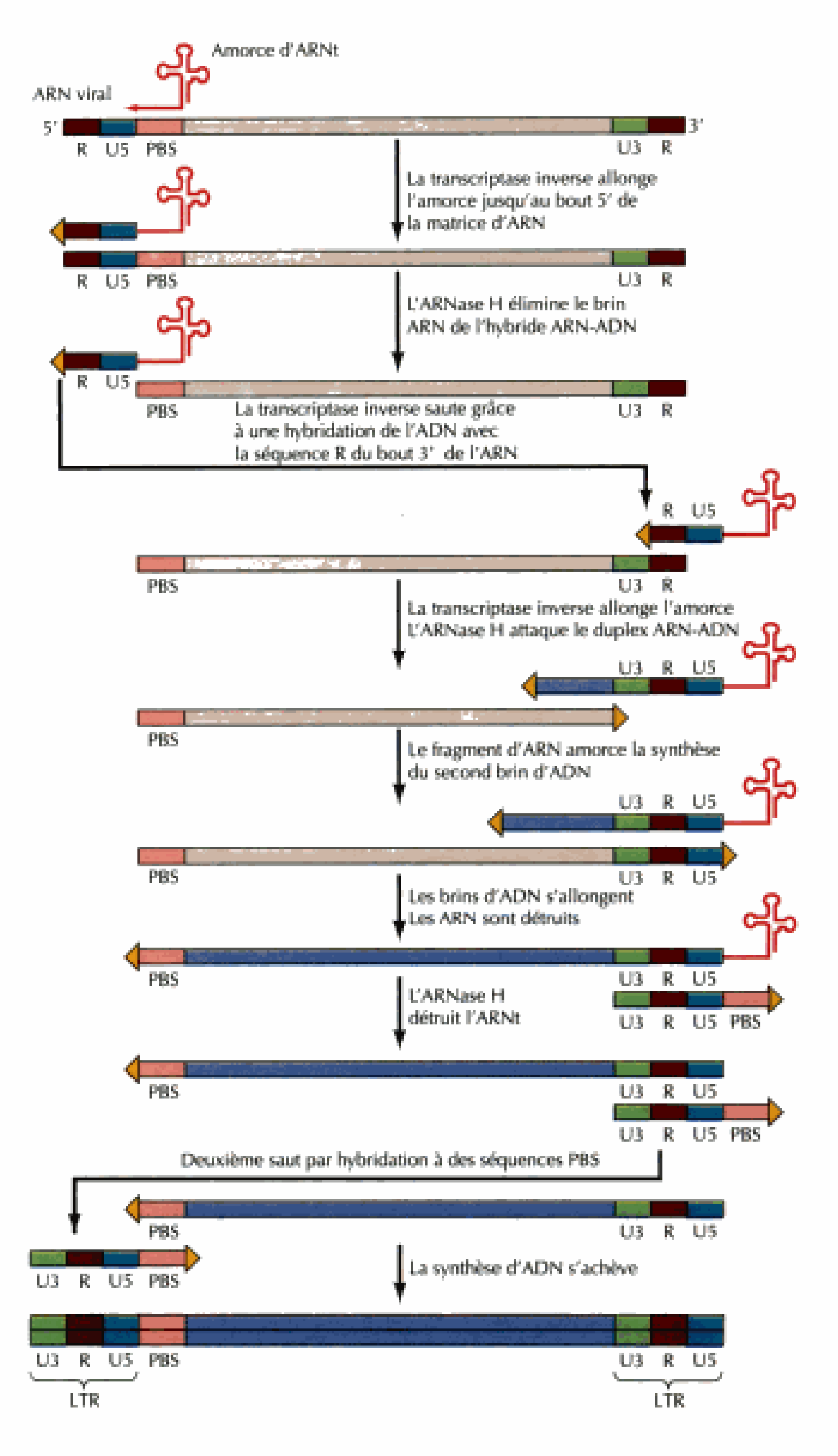


Figure 5.47
Formation des LTR au cours d'une transcription inverse. Un LTR comporte trois sortes de séquences : une courte séquence répétée (R) d'environ 20 nucléotides, présente à chaque bout de l'ARN viral, une séquence propre au bout 5' de l'ARN viral (U5) et une séquence propre au bout 3' de l'ARN viral (U3). Ces séquences se redoublent durant la synthèse d'ADN par le fait que la transcriptase inverse saute par deux fois d'un bout à l'autre de sa matrice. La synthèse commence sur une amorce d'ARNt fixée à un site d'attache d'amorce (PBS) voisin de U5 au bout 5' de l'ARN viral. La polymérase copie R, puis le brin ARN de l'hybride ARN-ADN est détruit par l'ARNase H. La polymérase saute ensuite à l'extrémité 3' de l'ARN viral, de façon à synthétiser un brin d'ADN complet, complémentaire à la matrice d'ARN. La polymérase saute de nouveau durant la synthèse du second brin d'ADN, amorcée elle aussi sur une amorce liée près du bout 5' de sa matrice. Ces sauts finissent par former des LTR qui comportent la suite des séquences U3–R-U5.

ARN suivie de la synthèse d'une copie ADN par la transcriptase inverse, puis d'une intégration à l'ADN cellulaire.

Les rétrotransposons de classe II diffèrent des rétrovirus par le fait qu'ils sont dépourvus de séquences LTR, bien qu'ils codent leur propre transcriptase inverse ; on trouve ce type de rétrotransposon chez certains mammifères, insectes (dont la drosophile), plantes et trypanosomes. Chez les



Figure 5.48
Structure d'un transposon de classe I. L'élément transposable Ty1 de levure est structuré à la façon d'un rétrovirus. Les séquences codant les protéines, dont le gène de la transcriptase inverse et les protéines d'intégration, sont encadrées par des LTR (appelés éléments δ) d'environ 330 paires de bases (pb). Le transposon intégré est encadré par de courtes répétitions à sens unique empruntées à l'ADN du site cible.

mammifères, la classe principale de ces rétrotransposons consiste en grands éléments répétitifs disséminés (**LINE**) qu'on retrouve à près de 50 000 exemplaires dans le génome (humain), dont ils occupent près de 5 % (voir chapitre 4). Un LINE entier est long de 6 à 7 kb, mais de nombreux membres de cette famille ont leur bout 5′ amputé (figure 5.49) ; à leur bout 3′, ces LINE comportent une série de séquences enrichies en A, dérivées, semble-t-il, par transcription inverse des queues poly-A ajoutées aux ARNm après leur transcription (voir chapitre 6). Les LINE sont, comme les autres éléments transposables, encadrés par de courtes répétitions directes de l'ADN du site cible, témoin que leur intégration a nécessité des incisions décalées suivies d'une synthèse réparatrice.

Puisque les LINE sont dépourvus de séquences LTR, il suit que le mécanisme de leur transcription inverse et de leur intégration à l'ADN chromosomique diffère de celui qui opère chez les rétrovirus et les rétrotransposons de classe I (ceux pourvus de LTR). Ces mécanismes restent obscurs, mais il semble que la transcription inverse s'amorce sur l'extrémité incisée de l'ADN chromosomique du site cible d'intégration (figure 5.50) ; le processus comprendrait la coupure de l'ADN cible par une nucléase codée par le rétrotransposon, mais on imagine bien que l'intégration se fasse en des sites où l'ADN a été endommagé de façon aspécifique. La transcription inverse commencerait alors au sein du tronçon poly-A du bout 3′ de l'ARN du transposon et se propagerait le long de la molécule ; l'autre brin d'ADN serait synthétisé à partir d'une amorce constituée par l'autre bout incisé de l'ADN du site cible, aboutissant à la synthèse et à l'intégration simultanée de l'ADN du rétrotransposon.

D'autres fragments de séquences d'ADN, incapables de coder leur propre transcriptase inverse, se transposent également *via* un intermédiaire ARN. Il s'agit de petits éléments disséminés hautement répétitifs (**SINE**), présents à près d'un million d'exemplaires dans les génomes de mammifère (voir chapitre 4). La principale famille de ces éléments sont les séquences *Alu*, longues d'environ 300 paires de bases ; à leur bout 3′, elles portent des séquences riches en A et sont encadrées par de courtes duplications des séquences d'ADN du site cible, qui rappellent la structure des rétroposons dépourvus de séquence LTR (par exemple, les LINE). On attribue l'existence des SINE à la transcription inverse de petits ARN, comme les ARNt et les petits ARN cytoplasmiques impliqués dans le transfert de protéines. Vu que les SINE ne codent plus aucun ARN fonctionnel, ils ne sont autres que des pseudogènes issus d'une transposition par ARN interposé. Les pseudogènes dérivés de maints gènes codant une protéine (les **pseudogènes remaniés**) furent aussi formés par transcription inverse d'un ARNm (figure 5.51) ; on les reconnaît aisément, non seulement à ce qu'ils se terminent par un segment enrichi en A, mais aussi à ceci que les introns présents dans le gène normal



Figure 5.49
Structure d'une LINE humaine. Les séquences LINE sont dépourvues de LTR, mais codent une transcriptase inverse ; à leur bout 3′, elles possèdent des tronçons de séquences riches en A (désignées A_n), qu'on croit issues de la transcription inverse des queues poly-A ajoutées au bout 3′ des ARNm. Comme d'autres éléments transposables, les LINE sont flanquées de courtes répétitions à sens unique de l'ADN du site cible.

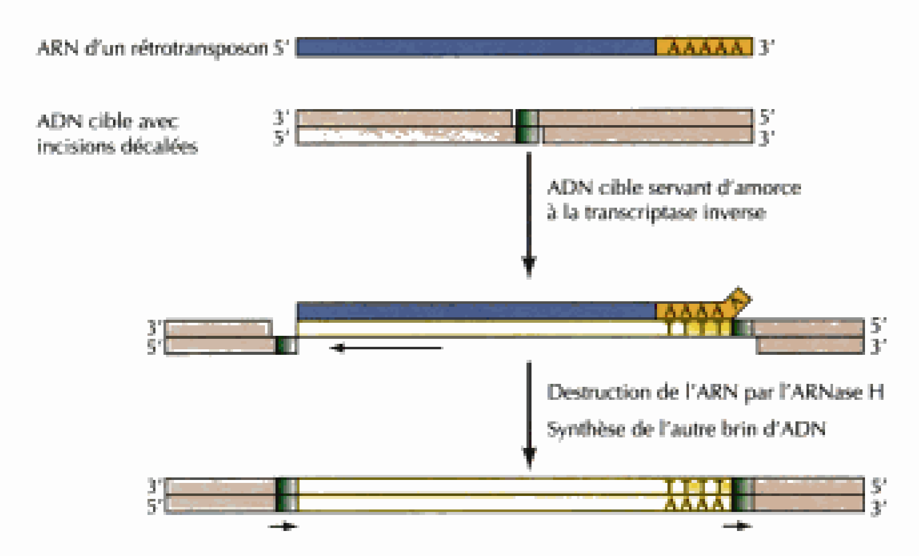
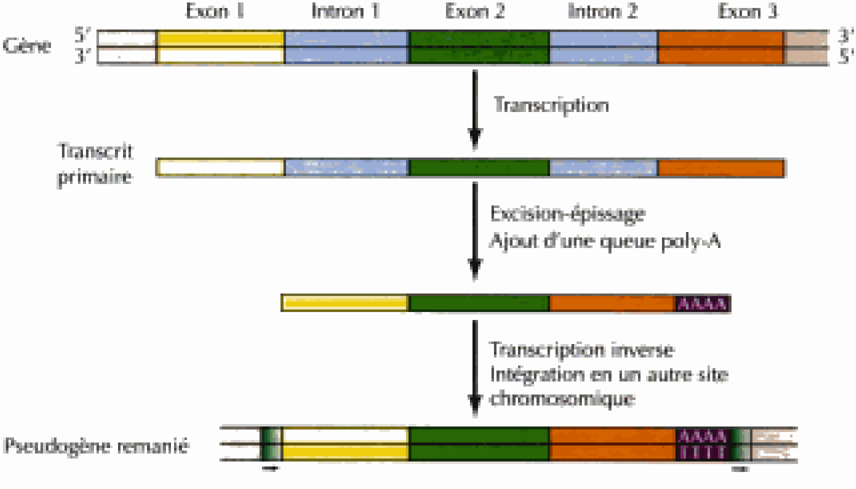


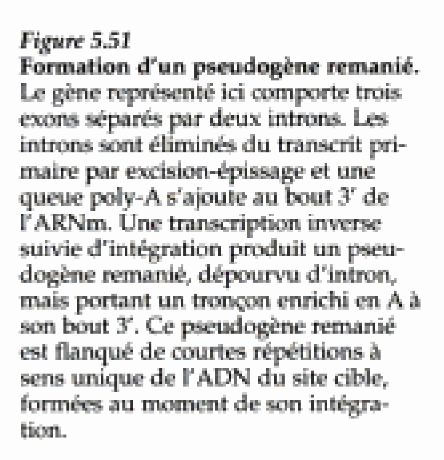
Figure 5.50
Modèle de transcription inverse et d'intégration de transposons dépourvus de LTR.
La transcription inverse, amorcée sur une cassure au site cible de l'ADN, démarre au sein de la queue poly-A présente au bout 3' de l'ARN du rétrotransposon. La synthèse du brin opposé de l'ADN du rétrotransposon s'amorce de même sur l'autre brin d'ADN du site cible.

correspondant furent excisés lors de la maturation de l'ARNm ; comme ces éléments sont dépourvus du gène de la transcriptase inverse, leur transposition exige probablement l'intervention d'une transcriptase inverse codée ailleurs dans le génome, éventuellement par un rétrotransposon de classe II, par exemple un LINE. On ignore comment se passe la transcription inverse et l'intégration des SINE et des autres pseudogènes remaniés, mais on peut imaginer une voie semblable à celle qui transpose les LINE.

Quoique les séquences très répétitives LINE et SINE représentent une portion significative de l'ADN génomique, on ne voit pas que leur transposition en des sites quelconques du génome soit de quelque utilité à la cellule qui les possède. Ces transposons induisent des mutations à chaque nouveau site où ils s'insèrent et, comme pour les mutations provoquées par d'autres agents, on doit s'attendre à ce que les mutations causées par l'intégration des transposons soient dangereuses pour la cellule ; on a en effet trouvé une relation entre des mutations dues à la transposition d'éléments LINE ou *Alu* et certains cas d'hémophilie, de dystrophie musculaire et de cancer colique. D'autre part, certaines mutations dues à la migration d'éléments transposables seraient bénéfiques pour autant qu'elles contribuent de façon positive à l'évolution des espèces : certains transposons des génomes de mammifère, par exemple, se sont révélés porteurs de séquences régulatrices qui commandent l'expression des gènes de leur voisinage.

Il semble que les rétrotransposons, outre leur rôle de mutagènes, contribuent à la diversité génétique en donnant à d'autres gènes l'occasion de se




Figure 5.51
Formation d'un pseudogène remanié.
Le gène représenté ici comporte trois exons séparés par deux introns. Les introns sont éliminés du transcrit primaire par excision-épissage et une queue poly-A s'ajoute au bout 3' de l'ARNm. Une transcription inverse suivie d'intégration produit un pseudogène remanié, dépourvu d'intron, mais portant un tronçon enrichi en A à son bout 3'. Ce pseudogène remanié est flanqué de courtes répétitions à sens unique de l'ADN du site cible, formées au moment de son intégration.

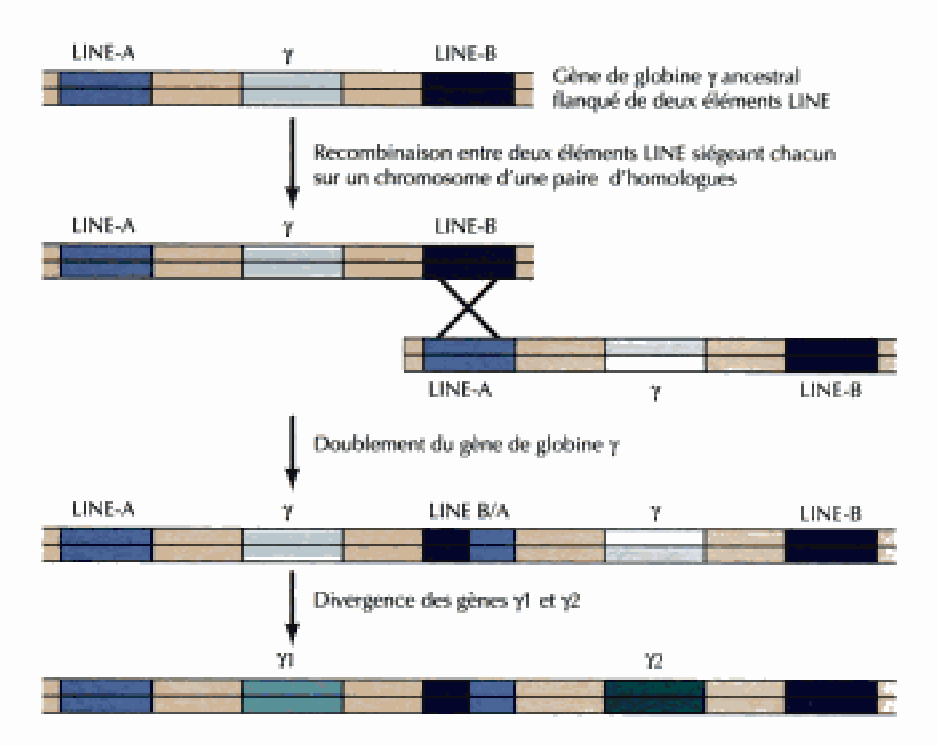


Figure 5.52
Duplication du gène de globine γ par recombinaison entre séquences LINE. Le gène de globine γ s'est doublé au cours de l'évolution des primates. Le gène ancestral était encadré par deux séquences LINE (LINE-A et LINE-B). La duplication du gène est due à la recombinaison de deux LINE portées chacune par un élément d'une paire de chromosomes homologues. L'expression du gène de globine γ redoublé (γ2) a alors évolué d'un type embryonnaire vers le type fœtal.

réarranger ; ainsi, une recombinaison entre éléments transposables homologues siégeant en divers endroits du génome provoquerait des réarrangements ou des duplications de gènes liés. En voici un exemple : durant l'évolution de la famille des gènes de globine des primates, une recombinaison de deux LINE s'est soldée par une duplication du gène de globine γ (figure 5.52) ; lors d'une évolution ultérieure, ce gène de globine γ a fini par s'exprimer non plus dans les tissus de l'embryon mais dans ceux du fœtus. Ces duplications de gène sont la clé de voûte de l'évolution, car (comme dans l'exemple cité) l'évolution profite de ce que des gènes dupliqués divergent dans leur fonction. L'intervention des rétrotransposons dans ce processus montre qu'ils sont capables de garantir le caractère évolutif des génomes.

Amplification de gène

Les réarrangements d'ADN évoqués jusqu'ici modifient la place qu'une séquence d'ADN donnée occupe dans le génome. L'**amplification de gène** est un type différent de modification de la structure du génome, car elle augmente le nombre d'exemplaires d'un gène au sein du génome. L'amplification de gène est due à ce que certaines régions d'un ADN se répliquent plusieurs fois en donnant de nombreuses copies de cette région (figure 5.53). On trouve ces séquences d'ADN amplifié sous forme soit de molécules extrachromosomiques, soit de faisceau en tandem au sein d'un chromosome. Dans chaque cas, le gène amplifié se manifeste par une expression accrue, du simple fait que la machinerie de transcription a beaucoup plus d'exemplaires du gène à sa disposition.

Parfois, on doit à l'amplification génique un accroissement d'expression d'un gène programmé quant au développement embryonnaire ; le prototype en est l'amplification des gènes d'ARN ribosomique dans l'ovocyte d'amphibien. L'ovocyte est en général une cellule énorme et sa maturation exige une intense synthèse protéique ; l'ovocyte d'amphibien en particulier est près d'un million de fois plus volumineux qu'une cellule somatique type et les protéines y sont synthétisées en grande quantité durant la maturation. Cette synthèse requiert une formation accélérée d'ARN ribosomial, à laquelle contribue en partie l'amplification des gènes d'ARN ribosomial. Comme

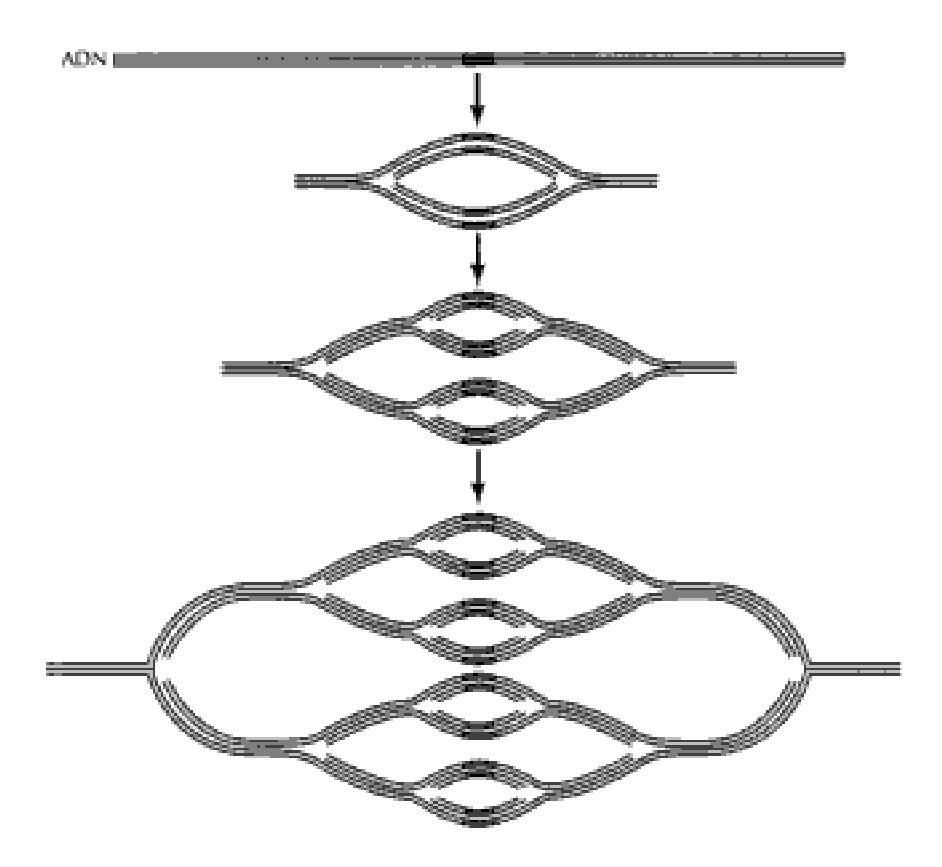


Figure 5.53
Amplification d'ADN. Une réplication à répétition donne de nombreuses répliques d'une zone chromosomique particulière

on l'a indiqué au chapitre 4, un génome contient déjà plusieurs centaines d'exemplaires de gènes d'ARN ribosomial, et assez pour couvrir les besoins en ARN ribosomial d'une cellule somatique ; dans l'ovocyte d'amphibien, ces gènes sont encore amplifiés 2 000 fois, ce qui porte à un million le nombre d'exemplaires par ovocyte. Chez la drosophile, on connaît un autre exemple d'amplification de gène programmée : dans son ovocyte, les gènes codant les protéines de la coque de cette cellule (gènes du chorion) sont amplifiés, pour subvenir aux besoins énormes en protéines de chorion. Néanmoins, l'amplification de gène est, comme les autres réarrangements programmés de gène, un événement plutôt rare, limité d'ailleurs à certains types cellulaires spécialisés ; la façon habituelle qu'a la cellule d'ajuster l'expression de ses gènes n'utilise pas couramment ce processus.

On rencontre aussi l'amplification de gène, alors en tant qu'événement anormal, dans les cellules cancéreuses ; elle aboutit à une plus grande expression des gènes qui poussent à une prolifération anarchique des cellules. On a découvert ce type d'amplification de gène dans des cellules cancéreuses devenues résistantes au méthotrexate, un médicament classique des cures de chimiothérapie. Le méthotrexate inhibe la dihydrofolate réductase, l'enzyme qui commande la synthèse des dNTP et, ce faisant, celle de l'ADN. Souvent, la résistance au méthotrexate s'installe après amplification du gène de la dihydrofolate réductase, amplification qui permet une production accrue d'enzyme, résultant en une décroissance de l'efficacité thérapeutique du méthotrexate. En outre, l'amplification génique dans les cellules cancéreuses active souvent l'expression de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire (oncogènes) et contribue, de ce fait, directement à la progression tumorale (voir chapitre 15) ; c'est le cas de l'oncogène *ErbB-2*, fréquemment amplifié dans les cancers du sein. Comme pour d'autres types de réarrangement d'ADN, on constate donc qu'une amplification de gène a des conséquences soit bénéfiques soit fâcheuses pour la cellule ou l'organisme chez lequel elle s'est produite.

Résumé

RÉPLICATION DE L'ADN

ADN polymérase : Plusieurs ADN polymérases ont une fonction particulière dans la réplication et la réparation de l'ADN des cellules de procaryotes et d'eucaryotes. Les ADN polymérases connues ne synthétisent jamais la chaîne d'ADN que dans le sens 5'→3', par ajout de dNTP à un brin amorce d'ADN préformé.

Fourche de réplication : Les brins de l'ADN parental se séparent et servent de matrice à la synthèse de deux brins nouveaux au niveau de la fourche de réplication. Un des nouveaux brins (le brin avancé) se forme de manière continue, l'autre (le brin retardé) se forme par assemblage de petits fragments d'ADN synthétisés à reculons par apport au sens global de la réplication. L'ADN polymérase, de concert avec d'autres protéines, synthétise les deux brins, avancé et retardé, d'ADN.

Fidélité de la réplication : Les ADN polymérases assurent à la réplication une haute fidélité du fait qu'elles choisissent la base adéquate à insérer dans la chaîne et qu'elles relisent l'ADN naissant pour en éliminer les éventuelles bases mésappariées.

Origine et amorçage de la réplication : La réplication d'ADN commence sur un site particulier à la réplication, site qui comporte des séquences où vont se fixer les protéines qui amorcent le processus.

Télomère et télomérase : réplication des bouts du chromosome : Les séquences répétitives des bouts du chromosome sont répliquées par une transcriptase inverse particulière (la synthétase du télomère ou télomérase) qui possède sa propre amorce d'ARN.

RÉPARATION DE L'ADN

Renversement direct d'une lésion de l'ADN : Quelques types de lésions courantes de l'ADN, comme les dimères de pyrimidines et les résidus guanine alkylés, se réparent par renversement direct de la réaction qui a causé la lésion.

Réparation par excision : La plupart des lésions de l'ADN sont réparées par excision de l'ADN endommagé. La lacune formée se comble par synthèse d'ADN, le brin complémentaire intact servant de matrice. Dans la réparation par excision de bases, une base isolée frappée d'un type particulier de lésion est éliminée de la molécule d'ADN. Par contre, les systèmes de réparation par excision de nucléotide reconnaissent tout une série de lésions qui déforment la structure de l'ADN et ils éliminent les bases endommagées en excisant l'oligonucléotide qui les contient. Un troisième système de réparation par excision élimine spécifiquement les bases mésappariées des brins d'ADN naissants.

Réparation postréplicative : Dans la réplication d'un ADN endommagé, il arrive que le brin néosynthétisé porte une lacune en face de la lésion du brin parental qui sert de matrice. Une lacune de ce type dans un ADN néosynthétisé se comblera par recombinaison avec le brin parental intact ou par une synthèse de réparation sujette à erreur, le brin parental endommagé servant de matrice.

RECOMBINAISON ENTRE SÉQUENCES D'ADN HOMOLOGUES

Les molécules d'ADN se recombinent par coupure et ressoudure : Le mécanisme moléculaire de recombinaison exige la coupure de la molécule d'ADN parentale suivie de sa ressoudure.

TERMES CLÉ

ADN polymérase, mutagène

fourche de réplication, fragment d'Okazaki, ADN ligase, brin avancé, brin retardé, primase, ARNase H, exonucléase, hélicase, protéine se fixant au brin monocaténaire, topo-isomérase

correction sur épreuve

origine de réplication, séquence à réplication autonome (ARS), complexe de l'origine de réplication (ORC)

télomère, télomérase (télomère synthétase), transcriptase inverse

dimère de pyrimidine, photoréactivation

réparation par excision de base, ADN glycosylase, endonucléase AP, réparation par excision de nucléotides, excinucléase, réparation de mésappariement

réparation par recombinaison, réparation sujette à erreur

recombinaison générale entre homologues, modèle de Holliday, jonction de Holliday

Modèles de la recombinaison entre homologues : L'alignement entre molécules d'ADN homologues s'appuie sur un appariement entre bases complémentaires. Les brins incisés de la molécule parentale envahissent une molécule apparentée, en formant un intermédiaire à brins croisés, appelé jonction de Holliday. Les molécules recombinantes se forment ensuite par scission et ressoudure des brins croisés.

RecA

Enzymes en jeu dans la recombinaison entre homologues : L'enzyme clé d'une recombinaison entre homologues est RecA, qui catalyse un échange de brins entre molécules d'ADN homologues ; d'autres enzymes coupent et détordent les ADN parentaux et résolvent les jonctions de Holliday.

RÉARRANGEMENTS DANS LES MOLÉCULES D'ADN

recombinaison propre à un site, lysogénie, antigène, immunoglobuline, récepteur de la cellule T

Recombinaison propre à un site : La recombinaison propre à un site se passe entre séquences d'ADN particulières qui sont reconnues par des protéines qui se chargent de la réaction. Chez les vertébrés, ce type de recombinaison joue un rôle capital, car il sculpte les gènes d'immunoglobulines et de récepteurs T lors de la maturation du système immunitaire.

transposition, élément transposable, transposon

Transposition* via *un intermédiaire d'ADN : La plupart des transposons constitués d'ADN migrent dans le génome quelle que soit la séquence de leur site d'insertion. Cependant, chez les levures et les protozoaires, la transposition de certaines séquences d'ADN singulières en des sites particuliers témoigne d'un réarrangement d'ADN programmé qui ajuste l'expression de certains gènes.

rétrovirus, transcriptase inverse, longue répétition terminale (LTR), rétrotransposon, LINE, SINE, pseudogène remanié,

Transposition* via *un intermédiaire d'ARN : La plupart des transposons des cellules d'eucaryotes se déplacent par une transcription inverse d'intermédiaires ARN, semblable à la réplication d'un rétrovirus. Parmi ces rétrotransposons, citons les séquences hautement répétitives LINE et SINE des génomes de mammifère.

amplification de gène

Amplification de gène : Une amplification de gène résulte de la réplication ininterrompue d'une région chromosomique déterminée. Parfois, elle sert à accroître l'expression d'un gène au cours du développement embryonnaire. On retrouve une amplification de gène dans les cellules cancéreuses, chez lesquelles elle active l'expression de gènes qui contribuent à la prolifération anarchique des cellules.

QUESTIONNAIRE

[redacted]

POUR EN SAVOIR PLUS

Références générales

Berg, D. E. and M. M. Howe, eds. 1989. *Mobile DNA*. Washington, DC: American Society of Microbiology.

Friedberg, E. C., G. C. Walker and W. Siede. 1995. *DNA Repair and Mutagenesis*. Washington, DC: ASM Press.

Kornberg, A. and T. A. Baker. 1992. *DNA Replication*. 2nd ed. New York: W. H. Freeman.

Kucherlapati, R. and G. R. Smith. eds. 1988. *Genetic Recombination*. Washington, DC: American Society of Microbiology.

Réplication de l'ADN

Blackburn, E. H. 1992. Telomerases. *Ann. Rev. Biochem.* 61: 113–129. [R]

Cairns, J. 1963. The chromosome of *Escherichia coli*. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 28: 43–46. [P]

Challberg, M. D. and T. J. Kelly. 1989. Animal virus DNA replication. *Ann. Rev. Biochem.* 58: 671–717. [R]

Diller, J. D. and M. K. Raghuraman. 1994. Eukaryotic replication origins: Control in space and time. *Trends Biochem. Sci.* 19: 320–325. [R]

Doublié, S. *et al.* 1998. Crystal structure of a bacteriophage T7 DNA replication complex at 2.2 angström resolution. *Nature* 391:251-258.[O]

Echols, H. and M. F. Goodman. 1991. Fidelity mechanisms in DNA replication. *Ann. Rev. Biochem.* 60: 477–511. [R]

Fangman, W. L. and B. J. Brewer. 1991. Activation of replication origins within yeast chromosomes. *Ann. Rev. Cell Biol.* 7: 375–402. [R]

Gavin, K. A., M. Hidaka and B. Stillman. 1995. Conserved initiator proteins in eukaryotes. *Science* 270: 1667–1671. [P]

Heintz, N. H., L. Dailey, P. Held and N. Heintz. 1992. Eukaryotic replication origins as promoters of bidirectional DNA synthesis. *Trends Genet.* 8: 376–381. [R]

Huberman, J. A. and A. D. Riggs. 1968. On the mechanism of DNA replication in mammalian chromosomes. *J. Mol. Biol.* 32: 327–341. [P]

Hubscher, U. and P. Thommes. 1992. DNA polymerase epsilon: In search of a function. *Trends Biochem. Sci.* 17: 55–58. [R]

Kelman, Z. and M. O'Donnell. 1995. DNA polymerase III holoenzyme: Structure and function of a chromosomal replicating machine. *Ann. Rev. Biochem.* 64: 171–200. [R]

Kornberg, A., I. R. Lehman, M. J. Bessman and E. S. Simms. 1956. Enzymic synthesis of deoxyribonucleic acid. *Biochim. Biophys. Acta* 21: 197–198. [P]

Kunkel, T. A. 1992. DNA replication fidelity. *J. Biol. Chem.* 267: 18251–18254. [R]

Marians, K. J. 1992. Prokaryotic DNA replication. *Ann. Rev. Biochem.* 61: 673–719. [R]

Ogawa, T. and T. Okazaki. 1980. Discontinuous DNA replication. *Ann. Rev. Biochem.* 49: 421–457. [R]

Perler, V. *et al.* 1996. Thermostable DNA polymerases. *Adv. Prot. Chem.* 48:377-430.[R]

Roca, J. 1995. The mechanisms of DNA topoisomerases. *Trends Biochem. Sci.* 20: 156–160. [R]

Stillman, B. 1994. Initiation of chromosomal DNA replication in eukaryotes. *J. Biol. Chem.* 269: 7047–7050. [R]

Stillman, B. 1994. Smart machines at the DNA replication fork. *Cell* 78: 725–728. [R]

Stinthcomb, D. T., K. Struhl and R. W. Davis. 1979. Isolation and characterization of a yeast chromosomal replicator. *Nature* 282: 39–43. [P]

Toyn, J. H., W. M. Toone, B. A. Morgan and L. H. Johnston. 1995. The activation of DNA replication in yeast. *Trends Biochem. Sci.* 20: 70–73. [R]

Waga, S. and B. Stillman. 1994. Anatomy of a DNA replication fork revealed by reconstitution of SV40 DNA replication *in vitro*. *Nature* 369: 207–212. [P]

Wang, J. C. 1991. DNA topoisomerases: Why so many? *J. Biol. Chem.* 266: 6659–6662. [R]

Wang, T. S.-F. 1991. Eukaryotic DNA polymerases. *Ann. Rev. Biochem.* 60: 513–552. [R]

Zakian, V. A. 1995. Telomeres: Beginning to understand the end. *Science* 270: 1601–1607. [R]

Réparation de l'ADN

Cleaver, J. E. 1968. Defective repair replication of DNA in xeroderma pigmentosum. *Nature* 218: 652–656. [P]

Cleaver, J. E. 1994. It was a very good year for DNA repair. *Cell* 76: 1–4. [R]

Dantzer, F & de Murcia, G. 1998. Quelles sont les ADN polymérases requises pour la réplication et la réparation de l'ADN chez les eucaryotes ? *Méd/Sci.* 14:704-711.[R]

Fishel, R., M. K. Lescoe, M. R. S. Rao, N. G. Copeland, N. A. Jenkins, J. Garber, M. Kane and R. Kolodner. 1993. The human mutator gene homolog *MSH2* and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 75: 1027–1038. [P]

Grossman, L., P. R. Caron, S. J. Mazur and E. Y. Oh. 1988. Repair of DNA-containing pyrimidine dimers. *FASEB J.* 2: 2696–2701. [R]

Hanawalt, P. C. 1994. Transcription-coupled repair and human disease. *Science* 266: 1957–1958. [R]

Kolodner, R. D. 1995. Mismatch repair: Mechanisms and relationship to cancer susceptibility. *Trends Biochem. Sci.* 20: 397–401. [R]

Lahue, R. S., K. G. Au and P. Modrich. 1989. DNA mismatch correction in a defined system. *Science* 245: 160–164. [R]

Leach, F. S. and 34 others. 1993. Mutations of a *mutS* homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell* 75: 1215–1225. [P]

Lehmann, A. R. 1995. Nucleotide excision repair and the link with transcription. *Trends Biochem. Sci.* 20: 402–405. [R]

Modrich, P. 1994. Mismatch repair, genetic stability, and cancer. *Science* 266: 1959–1960. [R]

Rousseau, F. *et al.* 1992. Les mutations instables : une nouvelle cause de maladies héréditaires. *La Recherche* n° 245:936.[R]

Sancar, A. 1994. Mechanisms of DNA excision repair. *Science* 266: 1954–1956. [R]

Sancar, A. 1995. Excision repair in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 270: 15915–15918. [R]

Sancar, A., and Rupp, W.D. 1983. A novel repair enzyme: UVRABC excision nuclease of *Escherichia coli* cuts a DNA strand on both sides of the damaged region. *Cell* 33: 249–260. [P]

Sancar, A. and G. B. Sancar. 1988. DNA repair enzymes. *Ann. Rev. Biochem.* 57: 29–67. [R]

Seeberg, E., L. Eide and M. Bjoras. 1995. The base excision repair pathway. *Trends Biochem. Sci.* 20: 391–397. [R]

Tanaka, K. and R. D. Wood. 1994. Xeroderma pigmentosum and nucleotide excision repair of DNA. *Trends Biochem. Sci.* 19: 83–86. [R]

Van Houten, B. 1990. Nucleotide excision repair in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* 54: 18–51. [R]

Recombinaison entre séquences d'ADN homologues

Agrawal, A., Eastman, R. M. & Schatz, D. G. 1998. Transposition mediated by RAG1 and RAG2 and its implication for the evolution of the immune system. *Nature* 394:744-751 [O]. Comm. p. 718.

DasGupta, C., A. M. Wu, R. Kahn, R. P. Cunningham and C. M. Radding. 1981. Concerted strand exchange and formation of Holliday structures by *E. coli* RecA protein. *Cell* 25: 507–516. [P]

Feng, G. *et al.* 1997. Structure of Cre recombinase complexed with DNA in a site-specific recombination synapse. *Nature* **389**:40-46.[O]

Holliday, R. 1964. A mechanism for gene conversion in fungi. *Genet. Res.* 5: 282–304. [P]

Kowalczykowski, S. C. and A. K. Eggleston. 1994. Homologous pairing and DNA strand-exchange proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 63: 991–1043. [R]

Meselson, M. and C. M. Radding. 1975. A general model for genetic recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 72: 358–361. [P]

Meselson, M. and J. J. Weigle. 1961. Chromosome breakage accompanying genetic recombination in bacteriophage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 47: 857–868. [P]

Miller, R. 1998. Échange de gènes entre bactéries. *Pour la Science* mars 1998:61-65.[R]

New, J. H. *et al.* (1998) Rad52 protein stimulates DNA strand exchange by Rad 51 and replication-protein A. *Nature* **391**:407; 401, 335.[O]

Potter, H. and D. Dressler. 1976. On the mechanism of genetic recombination: Electron microscopic observation of recombination intermediates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 3000–3004. [P]

Radding, C. M. 1991. Helical interactions in homologous pairing and strand exchange driven by RecA protein. *J. Biol. Chem.* 266: 5355–5358. [R]

Shinohara, A. and T. Ogawa. 1995. Homologous recombination and the roles of double-strand breaks. *Trends Biochem. Sci.* 20: 387–391. [R]

Szostak, J. W., T. L. Orr-Weaver, R. J. Rothstein and F. W. Stahl. 1983. The double-strand-break repair model for recombination. *Cell* 33: 25–35. [P]

Taylor, A. F. 1992. Movement and resolution of Holliday junctions by enzymes from *E. coli*. *Cell* 69: 1063–1065. [R]

West, S. C. 1992. Enzymes and molecular mechanisms of genetic recombination. *Ann. Rev. Biochem.* 61: 603–640. [R]

West, S. C. 1994. The processing of recombination intermediates: Mechanistic insights from studies of bacterial proteins. *Cell* 76: 9–15. [R]

Réarrangements dans les molécules d'ADN

Blackwell, T. K. and F. W. Alt. 1989. Molecular characterization of the lymphoid V(D)J recombination activity. *J. Biol. Chem.* 264: 10327–10330. [R]

Boeke, J. D., D. J. Garfinkel, C. A. Styles and G. R. Fink. 1985. Ty elements transpose through an RNA intermediate. *Cell* 40: 491–500. [P]

Borst, P. and D. R. Greaves. 1987. Programmed gene rearrangements altering gene expression. *Science* 235: 658–667. [R]

Capy, P. 1998. D'où viennent les gènes vagabonds ? *La Recherche* n° 307:44-47.[R]

Craig, N. L. 1995. Unity in transposition reactions. *Science* 270: 253–254. [R]

Davis, M. M. 1990. T cell receptor gene diversity and selection. *Ann. Rev. Biochem.* 59: 475–496. [R]

Dombroski, B. A., S. L. Mathias, E. Nanthakumar, A. F. Scott and H. H. Kazazian Jr. 1991. Isolation of an active human transposable element. *Science* 254: 1805– 1808. [P]

Fedoroff, N. V. 1989. About maize transposable elements and development. *Cell* 56: 181–191. [R]

Fedoroff, N. and D. Botstein. 1992. *The Dynamic Genome: Barbara McClintock's Ideas in the Century of Genetics*. Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Finnegan, D. J. 1989. Eukaryotic transposable elements and genome evolution. *Trends Genet.* 5: 103–107. [R]

Fitch, D. H. A., W. J. Bailey, D. A. Table, M. Goodman, L. Sieu, and J. L. Slightom. 1991. Duplication of the g -globin gene mediated by L1 long interspersed repetitive elements in an early ancestor of simian primates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 7396–7400. [P]

Gilboa, E., S. W. Mitra, S. Goff and D. Baltimore. 1979. A detailed model of reverse transcription and tests of crucial aspects. *Cell* 18: 93–100. [P]

Grandbastien, M.-A. 1992. Retroelements in higher plants. *Trends Genet.* 8: 103–108. [R]

Hozumi, N. and S. Tonegawa. 1976. Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 3628–3632. [P]

Janeway, C. A., Jr. and P. Travers. 1994. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. London/New York: Current Biology Ltd./Garland Publishing.

Landy, A. 1989. Dynamic, structural, and regulatory aspects of λ site-specific recombination. *Ann. Rev. Biochem.* 58: 913–949. [R]

Lewis, S. and M. Gellert. 1989. The mechanism of antigen receptor gene assembly. *Cell* 59: 585–588. [R]

Lieber, M. R. 1992. The mechanism of V(D)J recombination: A balance of diversity, specificity, and stability. *Cell* 70: 873–876. [R]

Luan, D. D., M. H. Korman, J. L. Jakubczak and T. H. Eickbush. 1993. Reverse transcription of R2Bm RNA is primed by a nick at the chromosomal target site: A mechanism for non-LTR retrotransposition. *Cell* 72: 595–605. [P]

McClintock, B. 1956. Controlling elements and the gene. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 21: 197–216. [P]

Oliver Pozo, E. J. *et al.* 1998. La poly (ADP-ribose) polymérase : un facteur de survie. *Médecine/Sciences* **14**:11961203.[R]

Singer, M. F. 1995. Unusual reverse transcriptases. *J. Biol. Chem.* 270: 24623–24626. [R]

Stark, G. R., M. Debatisse, E. Giulotto and G. M. Wahl. 1989. Recent progress in understanding mechanisms of mammalian DNA amplification. *Cell* 57: 901–908. [R]

Stark, G. R. and G. M. Wahl. 1984. Gene amplification. *Ann. Rev. Biochem.* 53: 447–491. [R]

Temin, H. M. 1989. Retrons in bacteria. *Nature* 339: 254–255. [R]

Tonegawa, S. 1983. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302: 575–581. [R]

Weiner, A. M., P. L. Deininger and A. Efstratiadis. 1986. Nonviral retroposons: Genes, pseudogenes, and transposable elements generated by the reverse flow of genetic information. *Ann. Rev. Biochem.* 55: 631–661. [R]

Whitcomb, J. M. and S. H. Hughes. 1992. Retroviral reverse transcription and integration: Progress and problems. *Ann. Rev. Cell Biol.* 8: 275–306. [R]

6 Synthèse et maturation des ARN

Les chapitres 4 et 5 ont traité de l'organisation et de la stabilité de l'ADN génomique, qu'on peut considérer comme un registre de prescriptions génétiques gouvernant toutes les activités cellulaires. Ces instructions seront mises en œuvre par une synthèse d'ARN et de protéines. La destinée d'une cellule ne dépend pas seulement des gènes dont elle hérite, mais aussi de la fraction de ces gènes qui s'exprime à chaque moment. En ajustant l'expression de ses gènes, la cellule s'adapte aux changements de son milieu et assure toute espèce d'activité manifestée par chaque type cellulaire composant un animal ou une plante complexes. Comme la cellule musculaire possède, par exemple, les mêmes gènes que la cellule hépatique, on doit admettre que les caractéristiques physiologiques qui différencient ces cellules ne sont pas dues à leur génome, mais aux programmes préétablis d'expression de gènes qui pilotent le développement embryonnaire et la différenciation cellulaire.

La première étape de l'expression d'un gène, à savoir sa transcription en ARN, est le lieu principal où l'expression du gène est modulée tant dans les cellules d'eucaryotes que dans celles de procaryotes. Les ARN des cellules d'eucaryotes sont ensuite remaniés de diverses façons — les introns, par exemple, leur sont retirés par excision-épissage — ce qui convertit le transcrit primaire en sa forme fonctionnellement compétente. Chaque type d'ARN a son rôle propre à jouer dans la cellule : les ARN messagers (ARNm) sont les matrices guidant la synthèse des protéines, les ARN ribosomiaux (ARNr) et les ARN de transfert (ARNt) servent à traduire les ARNm. Chez les eucaryotes, d'autres petits ARN encore entrent en jeu dans l'excision-épissage des ARNm et dans le tri des protéines. Ce chapitre traite de la transcription et de la maturation des ARN ; l'étape finale de l'expression des gènes, à savoir la traduction de l'ARNm en protéine, sera traitée au chapitre 7.

TRANSCRIPTION CHEZ LES PROCARYOTES

Comme cela s'est passé dans plusieurs domaines de la biologie moléculaire, les travaux sur *E. coli* ont servi de tremplin aux recherches sur le processus de transcription chez les eucaryotes. Comme on l'a indiqué au chapitre 3, c'est chez *E. coli* que fut découvert l'ARNm, de *E. coli* qu'on obtint et étudia pour la première fois une ARN polymérase, chez *E. coli* aussi que furent menées les recherches de pointe révélant les mécanismes fondamentaux qui

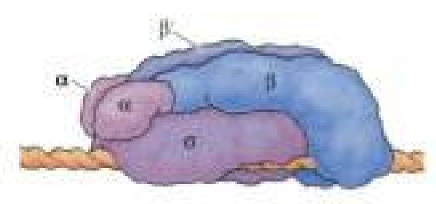


Figure 6.1
ARN polymérase de *E. coli*. L'enzyme complet comporte cinq protomères : deux α, un β, un β' et un σ. Ce dernier est fixé assez lâchement et se dissocie des quatre autres protomères, en laissant ce qu'on appelle le cœur de la polymérase.

modulent l'expression des gènes et permettent à la cellule de s'adapter à son milieu, notamment à sa richesse en nutriments. Ayant débrouillé le mécanisme de la transcription chez *E. coli*, on put alors établir la trame des recherches à mener sur les mécanismes, bien plus complexes, qui commandent l'expression des gènes de la cellule eucaryotique.

ARN polymérase et transcription

L'enzyme principal qui effectue la synthèse des ARN est l'**ARN polymérase**, qui catalyse la polymérisation des 5'-triphosphates de ribonucléoside (NTP) sur une matrice d'ADN. La synthèse d'un ARN ressemble à celle d'un ADN ; comme l'ADN polymérase, l'ARN polymérase catalyse la croissance de la chaîne d'ARN uniquement dans le sens 5'→3', mais, contrairement à l'ADN polymérase, l'ARN polymérase se passe d'une amorce préformée pour amorcer la synthèse d'une chaîne d'ARN ; en effet, la transcription démarre d'elle-même, en des points particuliers du début des gènes. Le processus d'amorçage est primordial, car c'est l'étape première où la transcription est ajustée.

Comme son ADN polymérase, l'ARN polymérase de *E. coli* est un enzyme complexe, fait de nombreuses chaînes polypeptidiques. L'enzyme natif comporte quatre types de protomères différents, appelés α, β, β' et σ (figure 6.1). Le protomère σ étant lié assez lâchement, on le sépare facilement des autres, pour obtenir le cœur de la polymérase, composé de deux protomères α, d'un protomère β et d'un protomère β'. À lui seul, le cœur de la polymérase catalyse la polymérisation des NTP en ARN, preuve que le processus catalytique de base de l'enzyme ne requiert pas σ ; cependant, sans la présence de σ, le cœur de la polymérase ne sait pas choisir les séquences d'ADN qui dictent l'amorçage normal de la transcription ; σ est donc requis pour trouver les sites corrects où la transcription de chaque gène démarre. La sélection de ces sites est un point critique de la transcription, car si cette dernière ne commence pas au début du gène, l'ARN formé sera inerte.

La séquence d'ADN à laquelle s'attache l'ARN polymérase avant de commencer à transcrire est le **promoteur**. C'est en comparant la séquence nucléotidique d'une série de gènes isolés de *E. coli* qu'on identifia les séquences d'ADN déterminant la fonction de promoteur ; ces comparaisons montrèrent que la région en amont du site d'amorçage comporte deux espèces de séquences qui se ressemblent dans tout une série de gènes. Ces séquences communes comptent chacune six nucléotides et se situent à environ 10 et 35 paires de bases en amont du site où s'amorce la transcription (figure 6.2) ; on les appelle élément -10 et élément -35, selon leur position par rapport au site d'amorçage, défini comme la position +1. La séquence des positions -10 et -35 n'est pas identique dans tous les promoteurs, mais suffisamment proche pour qu'on ait pu établir pour chacune une séquence consensus, c'est-à-dire celle des bases qu'on trouve le plus souvent en ces positions.

Un faisceau d'arguments expérimentaux prouve l'importance des éléments promoteurs -10 et -35. Premièrement, les gènes pourvus de promoteurs qui diffèrent des séquences consensus sont transcrits de façon moins efficace que les gènes dont les promoteurs concordent mieux avec ces séquences consensus. Deuxièmement, les mutations qui frappent les séquences consensus -10 et -35 ont une forte influence sur la fonction promotrice. Troisièmement, les sites auxquels l'ARN polymérase s'attache aux promoteurs furent identifiés directement par la méthode des empreintes, un



Figure 6.2
Séquences des promoteurs de *E. coli*. Chez *E. coli*, les promoteurs se caractérisent par une paire de séquences situées à -10 et -35 paires de bases en amont du site de démarrage de la transcription (+1). La séquence consensus indiquée correspond aux bases rencontrées le plus souvent dans une série de promoteurs.

moyen de connaître les sites auxquels les protéines se fixent à l'ADN (figure 6.3). Dans ce type d'expérience, on marque par un isotope une extrémité d'un fragment d'ADN, comme on le fait dans la méthode de séquençage de Maxam et Gilbert (voir figure 3.24) ; on incube ensuite cet ADN en présence de la protéine étudiée (par exemple, l'ARN polymérase) et on soumet l'ensemble à une digestion partielle par l'ADNase. Le principe de cette méthode est que la zone d'ADN à laquelle la protéine s'est attachée est protégée de la digestion par l'ADNase. On repère donc ces zones en comparant les produits de digestion de l'ADN associé à la protéine avec ceux obtenus en digérant de la même façon l'ADN qui n'a pas été incubé en présence de la protéine. Pour identifier les bases de l'ADN qui sont en contact avec la protéine, on choisit des variantes de cette méthode classique, mises au point à l'aide de réactifs chimiques qui clivent et modifient l'ADN au niveau de

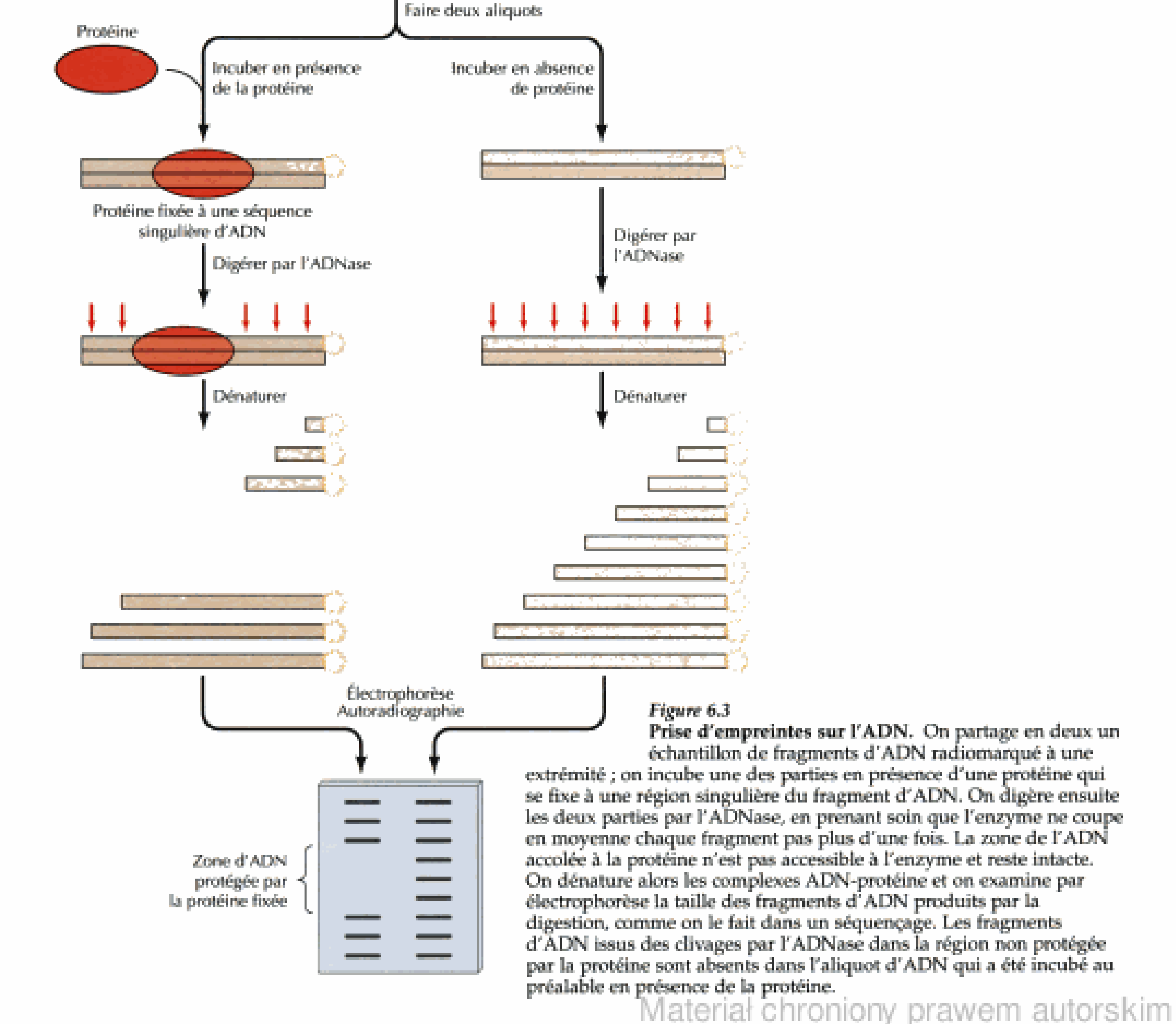
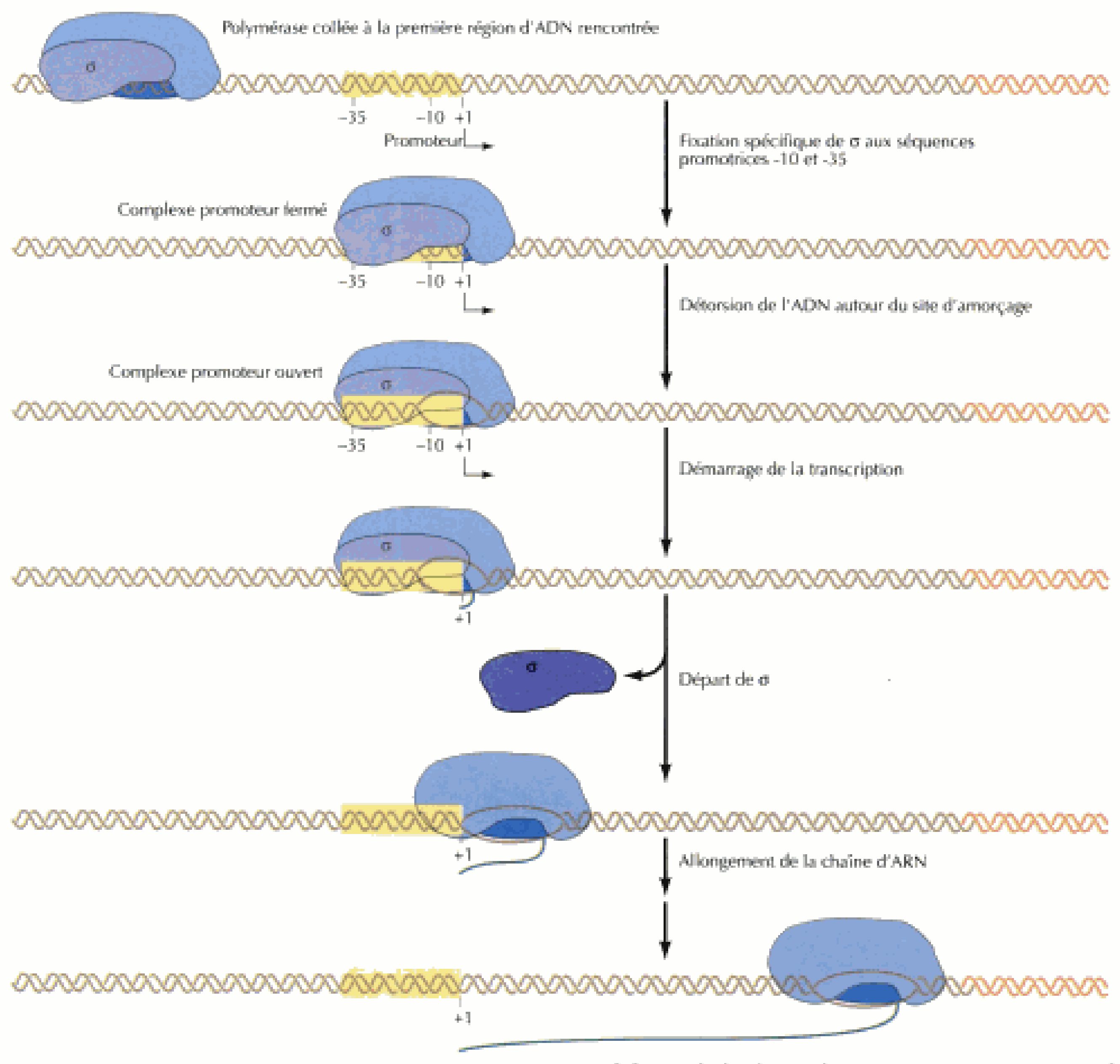


Figure 6.3
Prise d'empreintes sur l'ADN. On partage en deux un échantillon de fragments d'ADN radiomarqué à une extrémité ; on incube une des parties en présence d'une protéine qui se fixe à une région singulière du fragment d'ADN. On digère ensuite les deux parties par l'ADNase, en prenant soin que l'enzyme ne coupe en moyenne chaque fragment pas plus d'une fois. La zone de l'ADN accolée à la protéine n'est pas accessible à l'enzyme et reste intacte. On dénature alors les complexes ADN-protéine et on examine par électrophorèse la taille des fragments d'ADN produits par la digestion, comme on le fait dans un séquençage. Les fragments d'ADN issus des clivages par l'ADNase dans la région non protégée par la protéine sont absents dans l'aliquot d'ADN qui a été incubé au préalable en présence de la protéine.

Figure 6.4
Transcription par l'ARN polymérase de *E. coli*. La polymérase se fixe d'abord à une région quelconque de l'ADN et glisse sur la molécule d'ADN jusqu'à ce que son protomère σ s'attache aux éléments promoteurs -10 et -35, pour former un complexe promoteur fermé. La polymérase détord ensuite l'ADN autour du site d'amorçage, puis la transcription démarre par polymérisation de quelques NTP libres. Le protomère σ quitte alors le cœur de la polymérase, qui se met à glisser le long de l'ADN en allongeant la chaîne d'ARN naissante.

nucléotides particuliers. Cette recherche des empreintes a montré que l'ARN polymérase s'attache en général aux promoteurs sur une zone d'environ 60 paires de bases, entre les positions -40 et +20 (c'est-à-dire de 40 nucléotides en amont à 20 nucléotides en aval du site d'amorçage de la transcription). Le protomère σ se fixe spécifiquement aux séquences des régions promotrices -10 et -35, ce qui témoigne de l'importance de ces régions dans la fonction promotrice. De plus, certains promoteurs de *E. coli* comportent une troisième séquence, située en amont de la région -35, qui sert de site propre à la fixation du protomère α de l'ARN polymérase.

En l'absence de σ, l'ARN polymérase s'attache à la première séquence d'ADN rencontrée, avec une faible affinité ; en se fixant sélectivement aux régions -10 et -35, le rôle de σ est d'attirer la polymérase vers les promoteurs et, ce faisant, d'amorcer la transcription au début du gène (figure 6.4). Le produit de cette première fixation de la polymérase au promoteur est ce qu'on appelle un complexe avec un promoteur fermé, car l'ADN n'y est pas



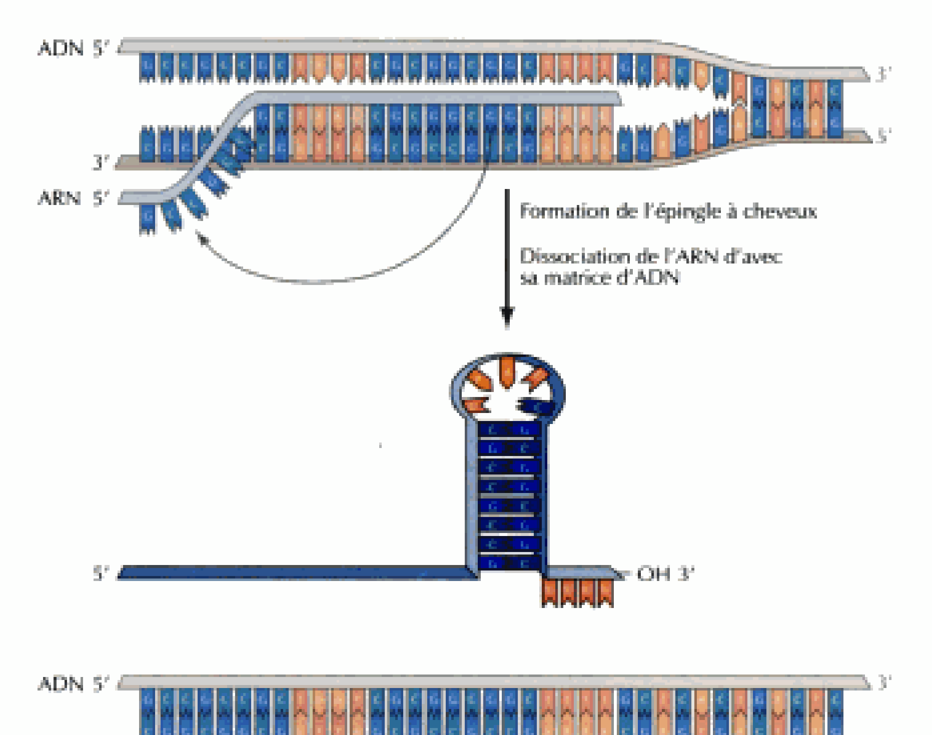


Figure 6.5
Achèvement de la transcription. L'achèvement de la transcription d'un gène se signale par une répétition inversée enrichie en GC suivie de quatre résidus A. La répétition inversée de l'ARN se replie en épingle à cheveux stable, qui pousse l'ARN à quitter la matrice d'ADN.

détordu. C'est la polymérase qui détord alors l'ADN sur une longueur d'environ 15 bases autour du site d'amorçage, pour en faire un complexe à promoteur ouvert dans lequel l'ADN monocaténaire peut servir de matrice à la transcription. La transcription démarre par l'union de deux NTP libres ; après addition de près de 10 nucléotides, le protomère σ quitte la polymérase, qui, elle, va quitter le promoteur et glisser le long de la matrice en continuant à allonger la chaîne d'ARN naissante. Au fur et à mesure qu'elle progresse, la polymérase détord l'hélice d'ADN devant elle et la retord derrière elle, maintenant sous forme monocaténaire les quelque 17 paires de bases de la région en train d'être transcrite.

La synthèse se prolonge jusqu'à ce que la polymérase rencontre un signal de terminaison, qui la met à l'arrêt, puis l'ARN est libéré de la polymérase et l'enzyme se dissocie de la matrice d'ADN. Le type de signal de terminaison habituel et le plus simple chez *E. coli* est une répétition inversée symétrique d'une région riche en GC, suivie d'au moins quatre résidus A (figure 6.5). La transcription de cette répétition inversée riche en GC aboutit à la formation d'un segment d'ARN capable de se replier en une structure stable en épingle à cheveux par appariement de bases complémentaires ; la formation de cette structure autocomplémentaire dans l'ARN démembre son association avec la matrice d'ADN et achève la transcription. Comme les liaisons hydrogène entre A et U sont plus faibles qu'entre G et C, il semble que la présence des résidus A en aval de la séquence répétitive inversée pousse l'ARN à quitter plus facilement sa matrice.

Répresseurs et freinage de la transcription

En 1950, François Jacob, Jacques Monod et André Lwoff furent les pionniers des découvertes sur la régulation de l'expression des gènes. Avec leurs collègues, ils examinèrent l'expression des enzymes de la voie qui consomme du lactose, utilisé comme source de carbone et d'énergie *via* son clivage en glucose et galactose (figure 6.6). L'enzyme qui effectue la scission du galactose (la β-galactosidase) et d'autres enzymes en jeu dans la production de

lactose ne s'expriment que quand les bactéries utilisent le lactose ; sinon, les cellules ne dépensent pas d'énergie à la synthèse d'ARN et de protéines inutiles. Le lactose induit donc la synthèse d'enzymes intervenant dans son propre métabolisme. Outre la β-galactosidase, le métabolisme du lactose requiert les produits de deux autres gènes étroitement liés : la perméase au lactose, qui transporte le lactose dans la cellule, et une transacétylase, dont on ignore encore le rôle dans le métabolisme du lactose. En se basant sur des expériences de génétique pure, Jacob, Monod et Lwoff trouvèrent comment était modulée l'expression de ces gènes, formulant de ce fait un modèle qui reste fondamental pour saisir le mécanisme de régulation de la transcription.

Le point de départ de cette recherche fut l'isolement de mutants défectifs dans la régulation des gènes en jeu dans l'utilisation du lactose. Ils obtinrent deux types de mutants : des mutants constitutifs, qui exprimaient les trois gènes même en l'absence de lactose, et des mutants non inductibles, qui ne pouvaient exprimer ces gènes même en présence de lactose. L'établissement de la carte génétique localisa ces mutants de la régulation à deux locus distincts, appelés *o* et *i* ; *o* siège immédiatement en amont du gène de structure de la β-galactosidase ; les mutations qui frappent *o* mènent à une expression constitutive, les mutants dans *i* sont soit constitutitfs soit non inductibles.

Ces chercheurs essayèrent de trouver le fonctionnement de ces gènes régulateurs par des expériences dans les quelles ils conjuguaient deux souches de bactéries pour obtenir des cellules diploïdes, pourvues de gènes hérités des deux parents (figure 6.7). L'examen de l'expression des gènes dans ces bactéries diploïdes mena à une percée magistrale, en montrant lequel des allèles de ces gènes de régulation était dominant ou récessif. Ainsi, quand ils conjuguaient des bactéries pourvues d'un gène *i* normal (i^+) avec des bactéries dont la mutation du gène *i* entraînait une expression constitutive (mutation i^-), les bactéries diploïdes obtenues étaient normalement inductibles ; le gènes i^+ normal était donc dominant par rapport au gène i^-, muté. Par contre, la conjugaison de bactéries normales avec des bactéries frappées d'une mutation o^c (expression constitutive) produisait des diploïdes de phénotype « expression constitutive », preuve que o^c domine o^+. D'autres expériences dans lesquelles ils combinaient des mutations dans *o* et *i* avec diverses mutations dans les gènes de structure révélèrent que *o* influence seulement l'expression de gènes auxquels il est lié physiquement, tandis que *i* touche l'expression de gènes portés par les deux exemplaires chromosomiques de la bactérie diploïde. Dans une cellule o^c/o^+, seuls les gènes de structure liés physiquement à o^c s'expriment de manière constitutive ; par contre, dans une cellule i^+/i^-, les gènes de structure des deux chromosomes

Lactose

β-galactosidase

Galactose + Glucose

Figure 6.6
Métabolisme du lactose. La β-galactosidase catalyse l'hydrolyse du lactose en glucose et galactose.

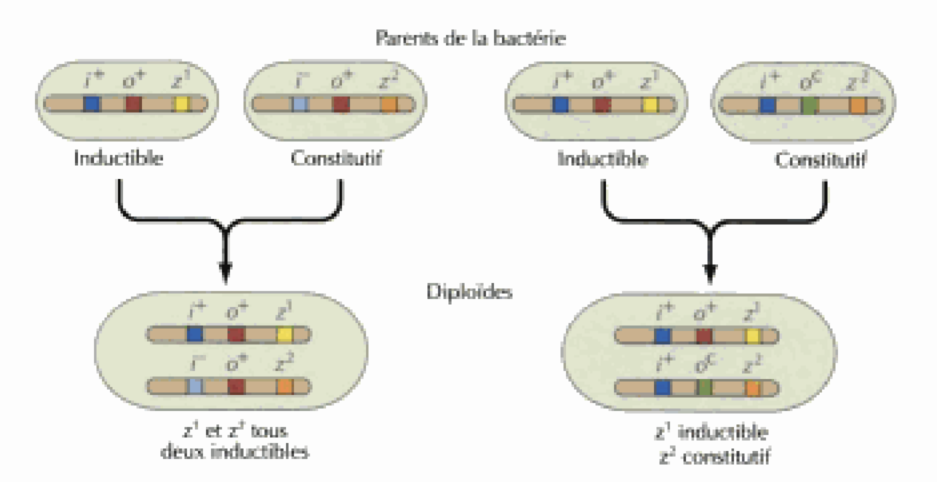


Figure 6.7
Régulation de l'activité de la β–galactosidase dans la cellule diploïde de *E. coli*. En conjuguant deux souches bactériennes, on obtient des cellules diploïdes qui possèdent des gènes issus des deux parents. On suppose ici qu'il est possible de reconnaître les gènes codant la β-galactosidase (les gènes *z*) d'après des mutations des gènes de structure, désignés z^1 et z^2. Chez un diploïde i^+/i^- (à gauche), les gènes de structure sont tous deux inductibles ; aussi i^+ est-il dominant par rapport à i^- : il gouverne l'expression du gène *z* des deux chromosomes. Par contre, chez un diploïde o^c/o^+ (à droite), le gène *z* lié à o^c s'exprime de manière constitutive, alors que celui qui est lié à o^+ est inductible. Le site *o* ne touche donc que l'expression du gène *z* qui lui est contigu sur le même chromosome.

subissent une régulation normale. Ces résultats permirent de conclure que *o* représente une région d'ADN qui commande la transcription des gènes adjacents, alors que *i* code un facteur de régulation (par exemple, une protéine) capable de diffuser dans la cellule et d'exercer sa commande sur les deux chromosomes.

La figure 6.8 expose le modèle de régulation des gènes déduit des expériences que nous venons de décrire. Les gènes codant la β-galactosidase, la perméase et la transacétylase s'expriment comme un tout, appelé **opéron** ; la transcription de l'opéron est sous la commande de *o* (l'**opérateur**), adjacent au site de démarrage de la transcription. Le gène *i* code une protéine qui module la transcription en se fixant à l'opérateur. Comme les mutants i^- (ils expriment le gène de manière constitutive) étaient récessifs, les chercheurs en conclurent que ces mutants ne forment pas de produit de gène fonctionnel ; ceci implique que le produit du gène *i* normal est un **répresseur** qui empêche la transcription quand il est attaché à *o*. Quand on introduit du lactose dans le milieu de culture, on provoque l'induction de l'opéron, car le lactose, en s'attachant au répresseur, empêche celui-ci de se lier à l'ADN de l'opérateur. Chez les mutants *i* réfractaires à l'induction (ils sont dominants sur i^+), le répresseur ne fixe pas de lactose et, de ce fait, ne peut pas démarrer l'expression de l'opéron.

Le modèle s'accorde parfaitement aux résultats des expériences de génétique dont il fut déduit. Dans les cellules i^-, il n'y a pas de synthèse de répresseur et l'opéron *lac* s'exprime de façon constitutive. Les cellules diploïdes i^+/i^- sont normalement inductibles car un répresseur compétent y est codé par l'allèle i^+. Enfin, chez les mutants o^c, l'opérateur compétent a été perdu et le répresseur est incapable de se fixer ; ces mutants o^c sont donc dominants, mais cette dominance ne porte que sur l'expression des gènes de structure liés à l'opérateur.

Depuis lors, ce modèle fut confirmé par une série d'expériences, notamment par celle de W. Gilbert ; en 1960, il isola le répresseur *lac* et étudia sa fixation à l'ADN de l'opérateur. L'analyse moléculaire localisa l'opérateur aux quelque 30 paires de bases d'ADN débutant à quelques bases en amont

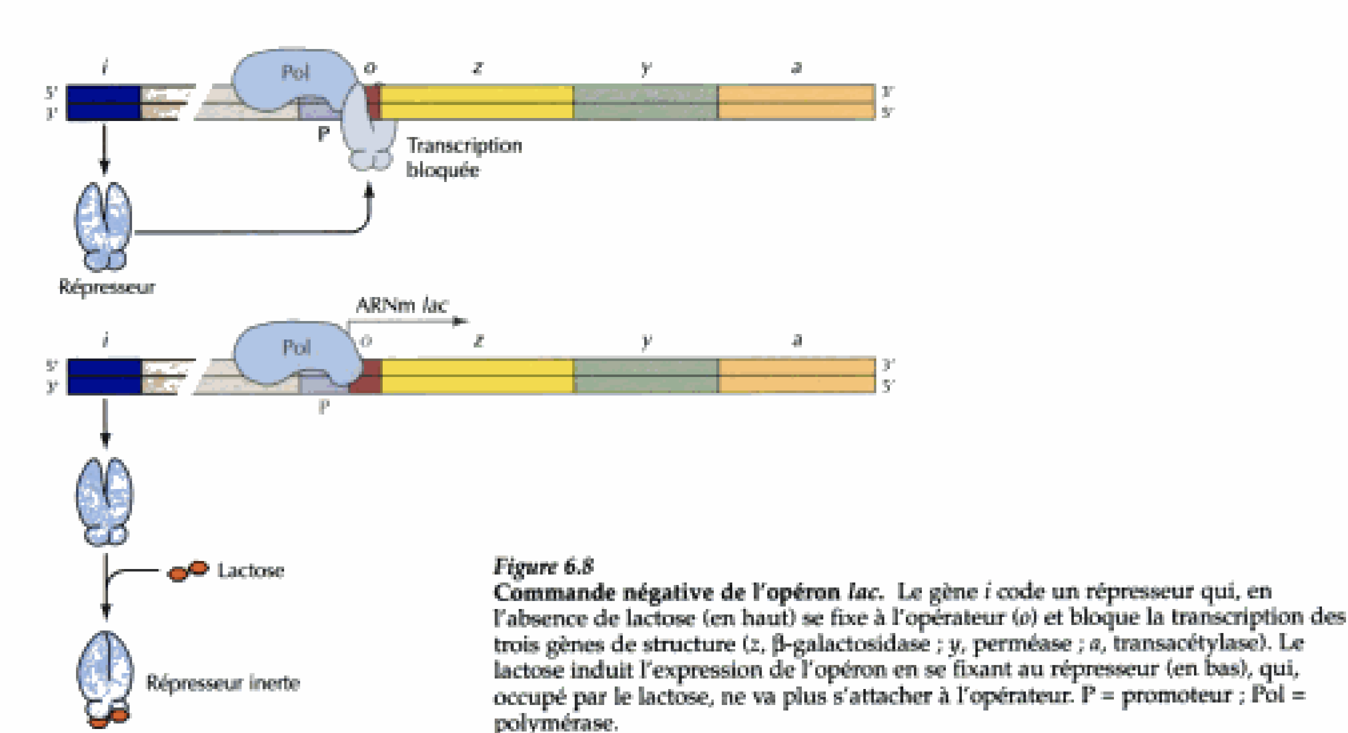


Figure 6.8
Commande négative de l'opéron *lac*. Le gène *i* code un répresseur qui, en l'absence de lactose (en haut) se fixe à l'opérateur (*o*) et bloque la transcription des trois gènes de structure (*z*, β-galactosidase ; *y*, perméase ; *a*, transacétylase). Le lactose induit l'expression de l'opéron en se fixant au répresseur (en bas), qui, occupé par le lactose, ne va plus s'attacher à l'opérateur. P = promoteur ; Pol = polymérase.

du site de démarrage de la transcription. En examinant les empreintes sur l'ADN, on identifia cette région au site où le répresseur va se fixer, et empêcher la transcription. Comme on l'avait prévu, le lactose s'attache au répresseur, qui dès lors ne peut plus se fixer sur l'ADN de l'opérateur ; comme prévu aussi, en modifiant les séquences au sein de l'opérateur, les mutations o^c empêchent le répresseur de s'y lier, ce qui provoque une expression constitutive du gène.

L'exemple de l'opéron lactose a permis d'établir le principe de base de la régulation des gènes, à savoir que la transcription est commandée par l'interaction de protéines régulatrices avec des séquences d'ADN particulières ; ce mode général de régulation s'applique aussi bien aux cellules d'eucaryotes qu'à celles de procaryotes. Les séquences régulatrices, du type de l'opéron, portent le nom de **éléments de commande agissant en *cis***, parce qu'elles influencent seulement l'expression des gènes qui leur sont liés sur la même molécule d'ADN. D'autre part, les protéines du type du répresseur portent le nom de **facteurs agissant en *trans***, parce qu'elles touchent l'expression de gènes situés sur d'autres chromosomes de la cellule. L'opéron *lac* est un exemple d'effet négatif, puisque la fixation du répresseur empêche la transcription ; ce n'est pas toujours le cas, maints facteurs actifs en *trans* mettent en route la transcription, au lieu de l'inhiber.

Facteurs accélérant la transcription

On s'aperçut que les répresseurs ne sont pas les seuls types de protéines ajustant la transcription quand on se mit à examiner les enzymes de *E. coli* qui métabolisent l'arabinose, un sucre à cinq carbones, qui, comme le lactose, remplace le glucose comme source de carbone et d'énergie. Les gènes codant trois enzymes en jeu dans le métabolisme de l'arabinose sont groupés en un opéron qui est sensible à l'arabinose (figure 6.9). L'opéron obéit au produit du gène appelé *ara*C, qui, comme le gène *lac i*, code une protéine active en *trans*, mais dans ce cas, la fixation de la protéine AraC à l'opérateur accélère la transcription au lieu de l'inhiber. On connaissait ce fait d'après les expériences de génétique, montrant qu'une fois la protéine AraC devenue non fonctionnelle, l'opéron *ara*C devenait non inductible, au lieu de s'exprimer de façon constitutive ; ce résultat est à l'opposé de l'influence des mutations *lac* i^- et montre que la protéine AraC active la transcription de l'opéron en présence d'arabinose, au lieu de la réprimer en son absence. Cette déduction a été confirmée par les biochimistes qui ont isolé la protéine AraC, qui, chargée d'une molécule d'arabinose, se fixe à un site situé juste en amont du promoteur et stimule la transcription.

L'exemple le mieux connu de commande positive chez *E. coli* est l'effet exercé par le glucose sur l'expression des gènes qui codent les enzymes nécessaires au catabolisme d'autres sucres (dont le lactose et l'arabinose) qui sont des sources de remplacement pour le carbone et l'énergie. Le glucose est le substrat préféré et tant qu'il est disponible, les enzymes nécessaires au catabolisme des substrats énergétiques de remplacement ne s'expriment pas ; si, par exemple, on cultive *E. coli* dans un milieu riche en glucose et lactose, l'opéron *lac* n'est pas induit et la bactérie ne catabolise

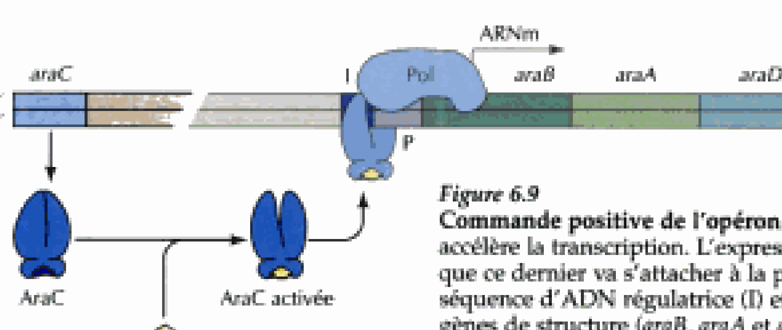


Figure 6.9
Commande positive de l'opéron arabinose. Le gène *ara*C code une protéine qui accélère la transcription. L'expression de l'opéron est induite par l'arabinose dès que ce dernier va s'attacher à la protéine AraC ; celle-ci se fixe alors à une séquence d'ADN régulatrice (I) et active la transcription. L'opéron comporte trois gènes de structure (*araB*, *araA* et *araD*). P = promoteur ; Pol = polymérase.

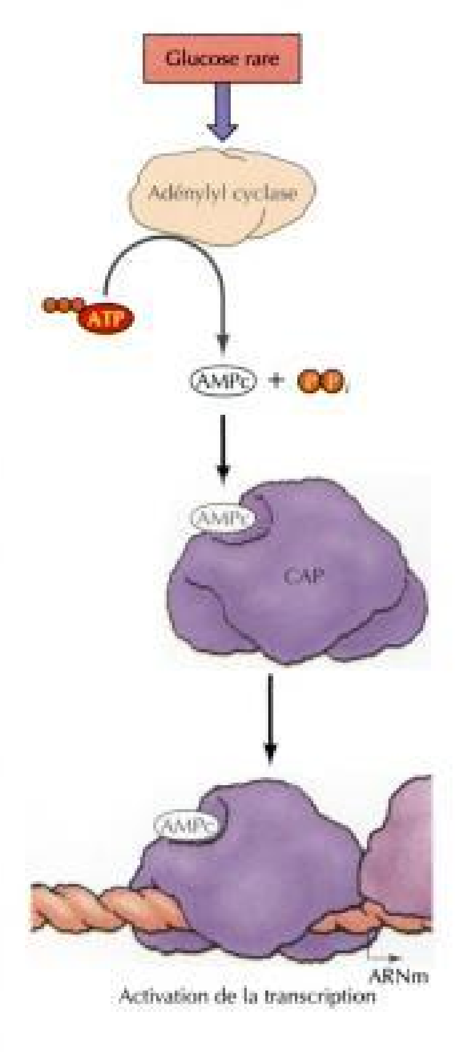


Figure 6.10
Régulation de l'expression d'un gène par le glucose. Des taux bas de glucose activent l'adényl cyclase, qui transforme l'ATP en AMP cyclique (AMPc). L'AMPc va ensuite s'attacher à la protéine activatrice du catabolisme (ACP) et accroît son affinité envers les séquences régulatrices de divers opérons impliqués dans le catabolisme d'autres sucres de remplacement, comme le lactose et l'arabinose.

que le glucose ; le glucose réprime donc l'opéron *lac*, même en présence de lactose, son inducteur normal.

On sait maintenant que la répression par le glucose (baptisée répression catabolique) s'effectue *via* un système de commande positif, asservi au taux d'AMP cyclique (AMPc)(figure 6.10). Chez les bactéries, l'adénylyl cyclase, l'enzyme qui transforme l'ATP en AMPc, est modulée de telle sorte que le taux d'AMPc s'accroît quand celui de glucose diminue ; cet AMPc se fixe alors à une protéine modulatrice de la transcription appelée protéine activant le catabolisme (CAP). Une fois occupée par l'AMPc, CAP va se fixer aux séquences d'ADN cible qui lui sont propres, situées approximativement, dans l'opéron *lac*, entre les bases -50 et -70, en amont du site de démarrage de la transcription. CAP accélère alors la transcription, en partie parce qu'il entre en contact avec le protomère α de l'ARN polymérase et facilite son arrimage au promoteur.

Atténuation de la transcription

Les mécanismes de commande, positive et négative, que nous venons de décrire agissent sur l'amorçage de la transcription. Un autre mécanisme, l'**atténuation transcriptionnelle**, gouverne certains gènes en jouant sur la capacité qu'a l'ARN polymérase de continuer à allonger la chaîne d'ARN au-delà de certains sites particuliers. Ce mode de régulation est le mieux connu pour l'opéron *trp* de *E. coli*, qui code cinq enzymes de la biosynthèse du tryptophane ; leur gène ne s'exprime qu'en l'absence de tryptophane dans le milieu de culture, car en sa présence, la cellule n'a pas besoin d'un supplément de tryptophane.

L'opéron *trp* est soumis partiellement à un répresseur qui, une fois occupé par le tryptophane, bloque la transcription de l'opéron (figure 6.11), mais l'atténuation transcriptionnelle garantit une commande d'autre nature, qui résulte en une régulation plus stricte que celle due à la seule répression de l'amorçage. Le site atténuateur siège à 162 nucléotides en aval du site de démarrage de la transcription. Si le taux de tryptophane est élevé, la transcription s'arrête le plus souvent en ce site ; c'est seulement quand le tryptophane se fait rare que la transcription va à son terme et produit un $ARNm^{Trp}$ fonctionnel.

Le mécanisme de l'atténuation dépend du fait que, chez les bactéries, la traduction est couplée à la transcription de sorte que les ribosomes commencent à traduire le bout 5' de l'ARNm pendant que la polymérase est en train d'achever la synthèse de cet ARNm. La vitesse de traduction peut donc influencer la structure de la chaîne d'ARN naissante, laquelle détermine si la transcription va se poursuivre. L'arrêt prématuré de la transcription dépend d'une structure en épingle à cheveux formée par complémentarité de bases entre deux séquences singulières de la chaîne d'ARNm naissante (figure 6.12). Cette structure apparaît si la traduction de la chaîne naissante avance à vitesse normale, comme c'est le cas en présence d'une quantité adéquate de tryptophane ; si le tryptophane vient à manquer, la synthèse protéique se bloque dans un région critique du message et les ribosomes fixés à l'ARNm empêchent la formation de la structure en épingle à cheveux typique de l'atténuation transcriptionnelle.

Comme la région critique de l'$ARNm^{Trp}$ comporte deux codons tryptophane adjacents, sa traduction dépend étroitement du taux de tryptopha-

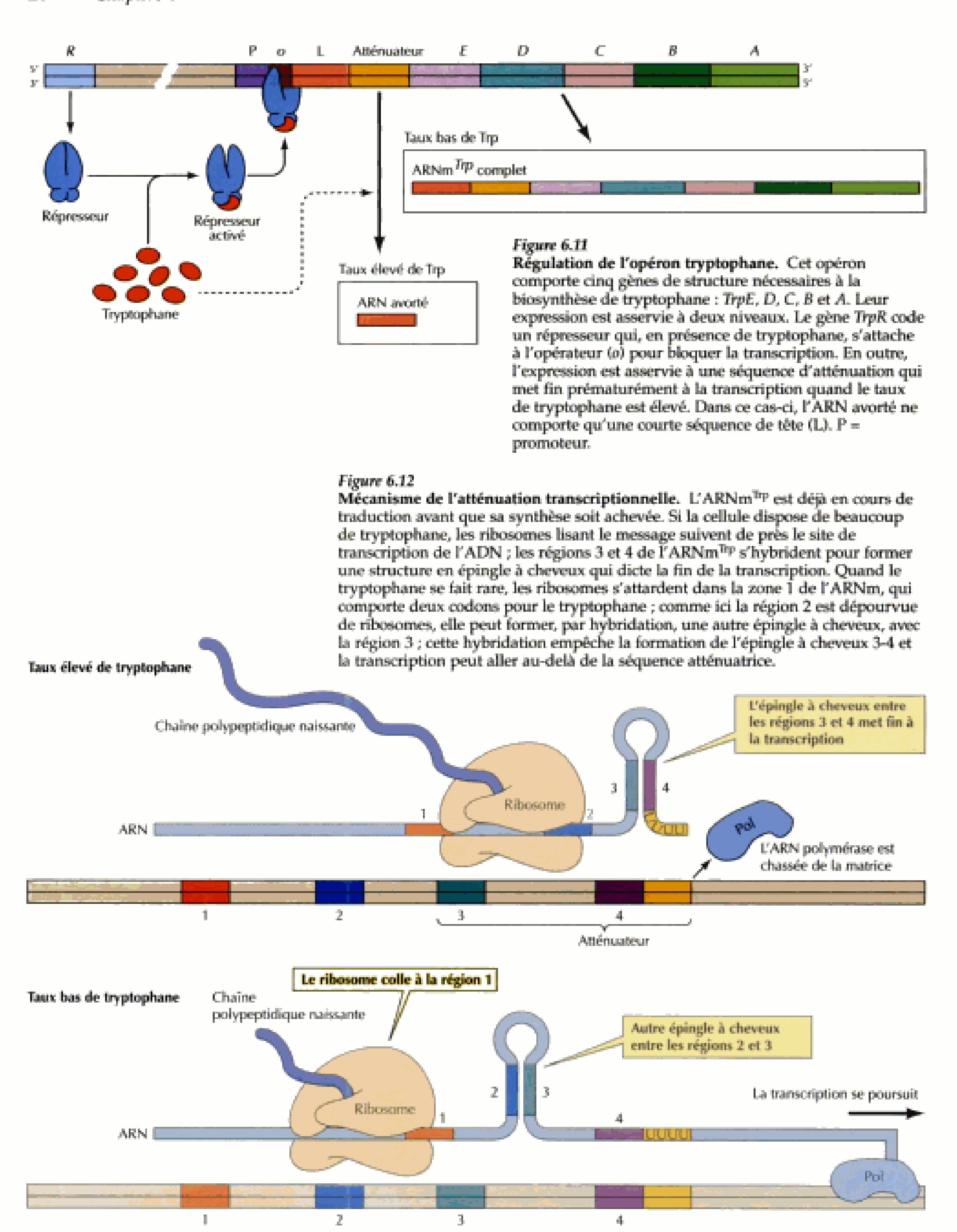


Figure 6.11
Régulation de l'opéron tryptophane. Cet opéron comporte cinq gènes de structure nécessaires à la biosynthèse de tryptophane : *TrpE, D, C, B* et *A*. Leur expression est asservie à deux niveaux. Le gène *TrpR* code un répresseur qui, en présence de tryptophane, s'attache à l'opérateur (*o*) pour bloquer la transcription. En outre, l'expression est asservie à une séquence d'atténuation qui met fin prématurément à la transcription quand le taux de tryptophane est élevé. Dans ce cas-ci, l'ARN avorté ne comporte qu'une courte séquence de tête (L). P = promoteur.

Figure 6.12
Mécanisme de l'atténuation transcriptionnelle. L'ARNm^{Trp} est déjà en cours de traduction avant que sa synthèse soit achevée. Si la cellule dispose de beaucoup de tryptophane, les ribosomes lisant le message suivent de près le site de transcription de l'ADN ; les régions 3 et 4 de l'ARNm^{Trp} s'hybrident pour former une structure en épingle à cheveux qui dicte la fin de la transcription. Quand le tryptophane se fait rare, les ribosomes s'attardent dans la zone 1 de l'ARNm, qui comporte deux codons pour le tryptophane ; comme ici la région 2 est dépourvue de ribosomes, elle peut former, par hybridation, une autre épingle à cheveux, avec la région 3 ; cette hybridation empêche la formation de l'épingle à cheveux 3-4 et la transcription peut aller au-delà de la séquence atténuatrice.

ne : là est le rapport entre l'atténuation de la transcription et la disponibilité du tryptophane. Quand le taux cellulaire de tryptophane est bas, les ribosomes attendent en cet endroit et la molécule d'ARNm^{Trp} continue d'être transcrite, quand ce taux est élevé, la traduction n'est pas freinée et la transcription prend fin prématurément.

POLYMÉRASES D'EUCARYOTES ET FACTEURS DE TRANSCRIPTION GÉNÉRAUX

Si la transcription se déroule *via* des mécanismes fondamentaux communs à toutes les cellules, elle est cependant beaucoup plus complexe chez les eucaryotes que chez les bactéries, comme en témoignent deux différences tranchées entre système eucaryotique et système procaryotique. D'abord, alors que tous les gènes bactériens sont transcrits par la même ARN polymérase, la cellule d'eucaryote possède plusieurs ARN polymérases, dont chacune transcrit une classe particulière de gènes. Ensuite, au lieu de se fixer directement aux séquences du promoteur, les ARN polymérases d'eucaryotes doivent entrer en contact avec quelques autres protéines avant de démarrer la transcription. Cette complexité accrue de la transcription eucaryote faciliterait la régulation sophistiquée de l'expression des gènes, exigée pour piloter l'activité de tous les types de cellules d'un organisme pluricellulaire.

ARN polymérases d'eucaryotes

La cellule d'eucaryote possède trois ARN polymérases nucléaires distinctes, qui transcrivent des classes différentes de gènes (tableau 6.1). Les gènes codant une protéine sont transcrits en ARNm par l'ARN polymérase II, les ARN ribosomiaux (ARNr) et les ARN de transfert (ARNt) sont transcrits par les ARN polymérases I et III. L'ARN polymérase I est particulièrement destinée à transcrire les trois grandes espèces d'ARNr, désignées 28S, 18S et 5,8S selon leur vitesse de sédimentation lors d'une centrifugation zonale. L'ARN polymérase III transcrit les gènes d'ARNt et des petites espèces d'ARNr (ARNr 5S). Certains des petits ARN en jeu dans l'excision-épissage et le transport de protéines (ARNpn et ARNpc) sont également transcrits par l'ARN polymérase III, tandis que d'autres le sont par l'ARN polymérase II. En outre, on trouve dans les mitochondries et les chloroplastes des ARN polymérases d'un autre type (qui rappellent les ARN polymérases bactériennes), qui transcrivent les ADN de ces organites.

Les ARN polymérases nucléaires sont toutes trois des enzymes composites, faits de 8 à 14 protomères différents. Bien qu'elles reconnaissent des promoteurs différents et transcrivent leur propre catégorie de gènes, elles ont plusieurs traits communs. Les deux plus grands protomères de toutes les ARN polymérases d'eucaryotes sont apparentés aux protomères β et β' de l'unique ARN polymérase de *E. coli* ; en outre, les ARN polymérases d'eucaryotes ont toutes cinq protomères en commun. En accord avec cette composition en protomères, les ARN polymérases d'eucaryotes possèdent plusieurs traits fondamentaux communs, notamment le besoin de s'attacher à d'autres protéines avant d'amorcer la transcription.

Tableau 6.1 Classes de gènes transcrits par les ARN polymérases d'eucaryotes

Types d'ARN synthétisés	ARN polymérase
Gènes nucléaires	
ARNm	II
ARNt	III
ARNr	
5,8S, 18S, 28S	I
5S	III
ARNpn et ARNpc	II et III[a]
Gènes mitochondriaux	Mitochondriale[b]
Gènes du chloroplaste	Chloroplastique[b]

[a] Certains petits ARN nucléaires (pn) et cytoplasmiques (pc) sont transcrits par la polymérase II, d'autres par la polymérase III.

[b] Les ARN polymérases mitochondriales et chloroplastiques ressemblent aux enzymes bactériens.

Facteurs de transcription généraux et amorçage de la transcription par l'ARN polymérase II

L'ARN polymérase II fut l'objet du plus grand nombre de travaux sur la transcription eucaryotique, parce qu'elle produit les ARNm sur lesquels sont traduites les protéines. Les premières expériences sur cet enzyme montraient que son pouvoir catalytique est nettement différent de celui de l'ARN polymérase procaryotique ; avec l'enzyme d'eucaryote, il est impossible de reproduire la transcription précise des gènes bactériens telle qu'on l'effectue *in vitro* en ajoutant l'ARN polymérase pure à l'ADN pourvu d'un promoteur ; on connaît la raison de cette différence depuis 1979, quand Robert Roeder

et ses collègues découvrirent que l'ARN polymérase II n'est capable de démarrer une transcription que si d'autres protéines sont présentes dans le milieu d'incubation ; dans le système eucaryotique, la transcription nécessite donc des facteurs d'amorçage distincts qui, contrairement au facteur σ bactérien, ne sont pas associés à la polymérase.

En fractionnant des extraits de noyaux, les biochimistes ont maintenant identifié les protéines singulières (appelées **facteurs de transcription**) auxquels la polymérase doit absolument s'attacher avant d'amorcer la transcription ; c'est en identifiant et en caractérisant ces facteurs qu'on a fait un grand pas en avant dans la compréhension de la transcription chez les eucaryotes. On a identifié deux types de facteurs de transcription. Les **facteurs de transcription généraux** interviennent dans la transcription à partir de tous les promoteurs d'ARN polymérase II et font ainsi partie de la machinerie transcriptionnelle fondamentale. D'autres facteurs de transcription (commentés plus loin dans ce chapitre) s'attachent à des séquences d'ADN qui commandent l'expression de gènes particuliers et, ce faisant, gouvernent la régulation de l'expression de ces gènes.

Dans les systèmes reconstitués *in vitro*, il faut au moins cinq facteurs de transcription généraux différents pour amorcer la transcription par l'ARN polymérase II (figure 6.13). Le promoteur de beaucoup de gènes comporte une séquence similaire à la séquence TATAA, siégeant de 25 à 30 nucléotides en amont du site de démarrage de la transcription ; cette séquence appelée **boîte TATA** ressemble à l'élément de séquence -10 des promoteurs bactériens ; on a montré le rôle des boîtes TATAA dans l'amorçage de la transcription en y introduisant des mutations. La formation d'un complexe transcriptionnel débute par la fixation d'un facteur de transcription général appelé TFIID à la boîte TATA (*TF* signifie facteur de transcription, II indique la polymérase II) ; la protéine TFIID comporte elle-même plusieurs protomères, dont une **protéine se fixant à la boîte TATA (TBP)**, qui reconnaît spécifiquement la séquence consensus TATAA, ainsi que d'autres polypeptides appelés **facteurs associés à TBP (TAF)**. TBP recrute alors un autre facteur de transcription général (TFIIB), pour former un complexe TBP-TFIIB collé au promoteur (figure 6.14). À son tour, TFIIB sert d'adaptateur pour l'ARN polymérase, qui vient s'ancrer au complexe TBP-TFIIB de concert avec un troisième facteur TFIIF.

Une fois l'ARN polymérase attachée au promoteur, il faut encore la fixation de deux autres facteurs (TFIIE et TFIIH) pour que la transcription s'amorce. TFIIH est un facteur composite qui semble jouer au moins deux rôles importants : deux de ses protomères sont des hélicases, qui détordent l'ADN au voisinage du site d'amorçage (comme on l'a vu au chapitre 5, ces protomères sont aussi indispensables à la réparation par excision de nucléotides) ; un autre protomère de TFIIH est une protéine-kinase qui phosphoryle des séquences répétitives du domaine C-terminal du grand protomère de l'ARN polymérase II. Il semble que la phosphorylation de ces séquences libère la polymérase de son association avec le complexe d'amorçage et lui permette de commencer à glisser sur la matrice pour allonger la chaîne d'ARN naissante.

Outre la boîte TATA, le promoteur de maints gènes transcrits par l'ARN polymérase II comporte un autre élément de séquence important (une séquence d'amorçage, ou Inr) qui occupe le site d'amorçage de la transcription. En outre, on connaît des promoteurs d'ARN polymérase II qui sont constitués uniquement d'un élément Inr, sans boîte TATA ; l'amorçage sur ce type de promoteur exige encore TFIID (et TBP), même si TBP n'est pas censé reconnaître ces promoteurs puisqu'il s'attache directement à la séquence TATA ; aussi d'autres protomères de TFIID (des TAF) s'attacheraient-ils aux séquences Inr, ce qui attirerait TBP sur le promoteur. Enfin TFIIB, l'ARN polymérase II puis d'autres facteurs de transcription viennent s'attacher,

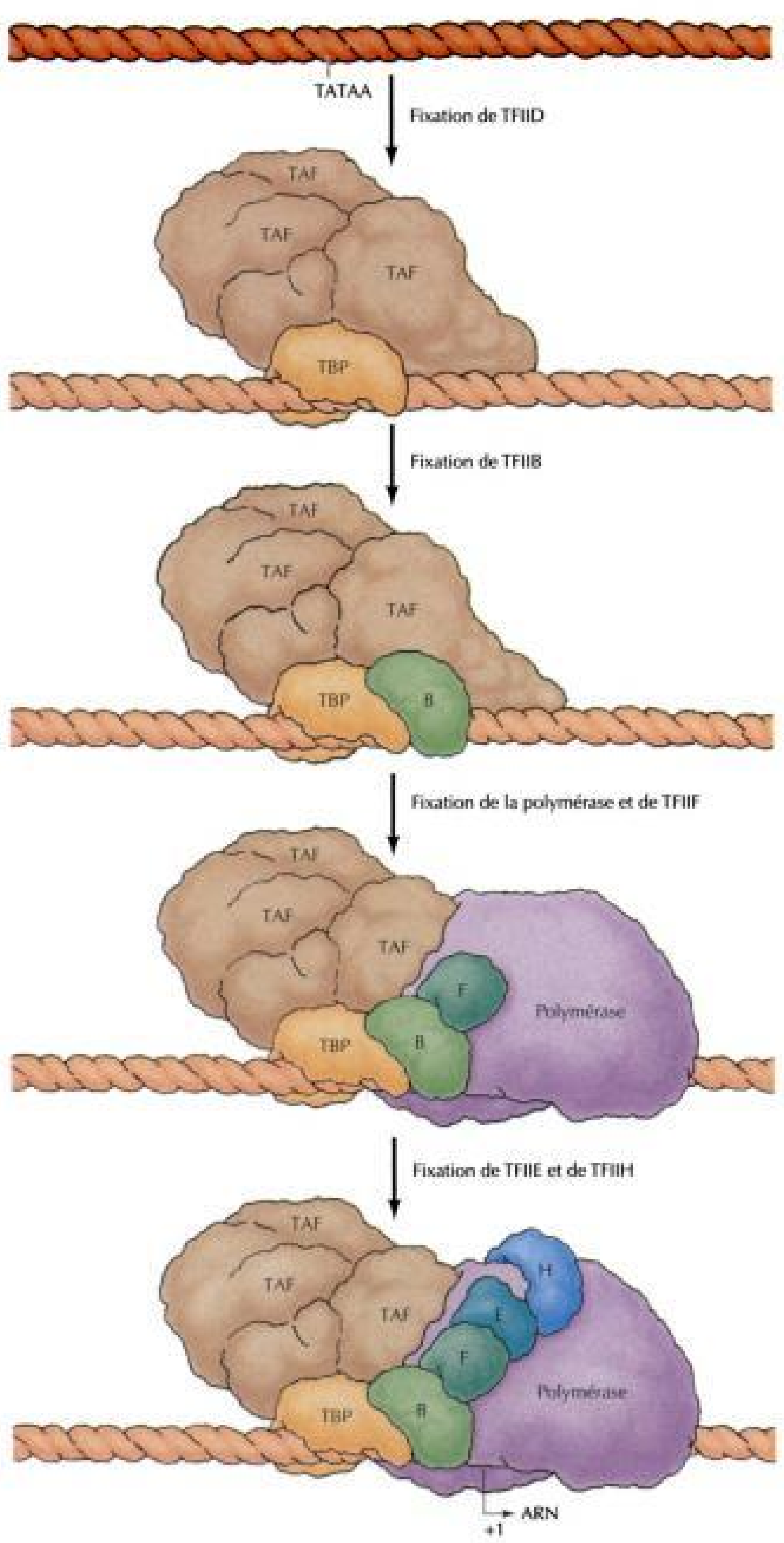


Figure 6.13
Formation du complexe de transcription de l'ARN polymérase II. Parmi les promoteurs reconnus par l'ARN polymérase II, beaucoup possèdent une boîte TATA (séquence consensus TATAA) de 25 à 30 nucléotides placée en amont du site où la transcription démarre. Cette séquence est reconnue par le facteur de transcription TFIID, composé de la protéine reconnaissant la boîte TATA (TBP) et des facteurs associés à TBP (TAF). TFIIB (B) vient ensuite s'attacher à TBP, puis c'est au tour de la polymérase, accompagnée de TFIIF (F). Enfin, TFIIE (E) et TFIIH (H) viennent compléter le complexe.

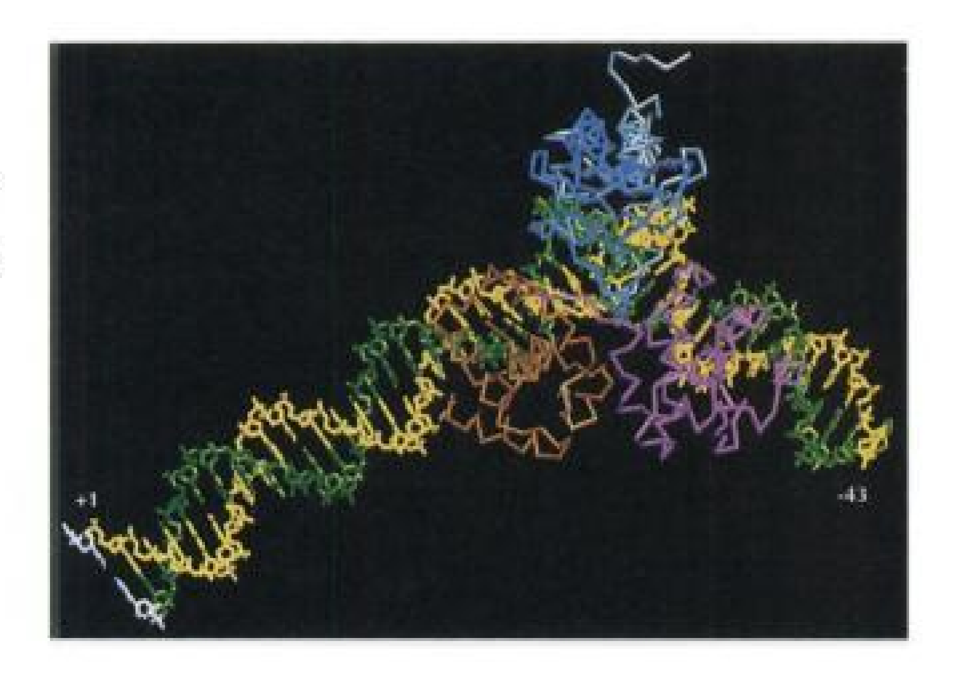


Figure 6.14
Modèle de complexe TBP-TFIIB attaché à l'ADN. On a dessiné les brins, jaune et vert, du squelette de l'ADN, avec le site +1 sur lequel démarre la trancription. TBP comporte deux parties, l'une colorée en bleu clair, l'autre en bleu foncé, les deux parties de TFIIB sont en brun et violet. Remarquez que TBP introduit un coude d'environ 110 degrés dans l'ADN. (Tiré de Nikolov *et al.*, 1995, *Nature* **377** :119.)

comme on vient de le décrire. TBP joue donc un rôle primordial dans l'amorçage de la transcription par la polymérase II, même sur les promoteurs dépourvus de boîte TATA.

Malgré la mise au point de systèmes d'études *in vitro* qui ont permis de caractériser plusieurs facteurs de transcription basaux, les mécanismes de transcription par l'ARN polymérase II des cellules d'eucaryotes sont encore sous certains aspects bien obscurs. Le système de recrutement en cascade des facteurs de transcription décrit ici est le système de base essentiel à la transcription *in vitro* ; d'autres facteurs pourraient intervenir dans la cellule. De plus, il semble que l'ARN polymérase II puisse s'associer à certains facteurs de transcription *in vivo*, avant que le complexe transcriptionnel ne s'assemble sur l'ADN. On a découvert en effet dans les cellules de levure et de mammifère des complexes préformés comportant l'ARN polymérase II et les facteurs TFIIB, TFIIF et TFIIH. Ces gros complexes (appelés holoenzymes d'ARN polymérase II) seront attirés sur un promoteur par l'entremise de TFIID (figure 6.15). On ignore donc encore si c'est l'arrivée un à un des facteurs sur les promoteurs ou l'attachement de l'holoenzyme d'ARN polymérase II complet sur les promoteurs qui prédominent dans la cellule. Enfin, on connaît mal le rôle de beaucoup de facteurs de transcription basaux. Toutes ces inconnues concernant les processus clé de la synthèse des ARNm eucaryotiques font de ce domaine l'un des plus fouillés de la biologie moléculaire et cellulaire contemporaine et, partant, l'un de ceux où les avancées sont les plus marquantes.

Figure 6.15
Holoenzyme d'ARN polymérase II. Le holoenzyme se compose d'un complexe préformé d'ARN polymérase II, et de TFIIB, TFIIE, TFIIF et TFIIH, tous attirés directement sur le promoteur par des interactions avec TFIID (TBP + TAF).

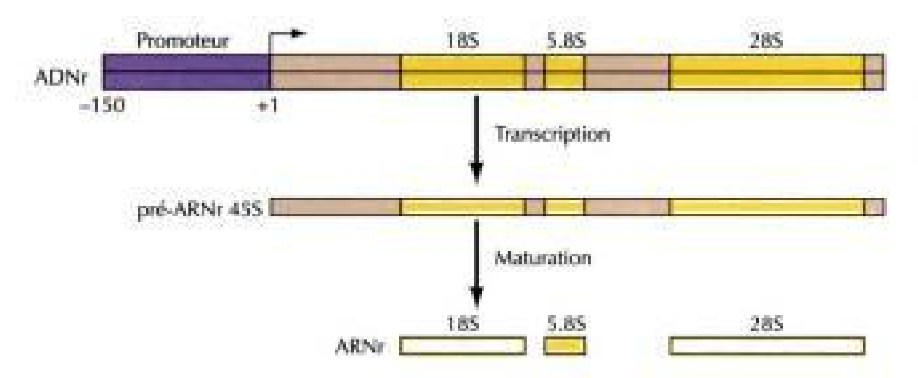


Figure 6.16
Gène d'ARN ribosomial. L'ADN ribosomial (ADNr) est transcrit en une immense molécule d'ARNr (préARNr de 45S), tronçonné par la suite en ARNr 28S, 18S et 5,8S.

Transcription par les ARN polymérases I et III

Rappelons que ce sont d'autres ARN polymérases qui transcrivent les gènes d'ARN ribosomial et d'ARN de transfert dans les cellules d'eucaryote. Cependant, les trois ARN polymérases exigent toutes des facteurs de transcription auxiliaires pour atteindre les séquences promotrices adéquates ; en outre, bien que chaque type d'ARN polymérase reconnaisse des promoteurs qui lui sont propres, il semble exister un facteur de transcription universel, à savoir la protéine se fixant à la boîte TATA (TBP), qui amorce la transcription par les trois enzymes.

L'ARN polymérase I ne sert à transcrire que les gènes d'ARN ribosomial, accumulés l'un derrière l'autre en tandem. Leur transcription produit un immense transcrit, le pré-ARNr 45S, qui sera scindé en ARNr 28S, 18S et 5,8S (figure 6.16). Le promoteur des gènes d'ARNr s'étend sur à peu près les 150 bases siégeant directement en amont du site d'amorçage de la transcription ; ses séquences sont reconnues par deux facteurs de transcription, UBF (pour *u*pstream *b*inding *f*actor) et SL1 (pour *s*electivity *f*actor 1), qui se fixent solidairement au promoteur et y attirent la polymérase, pour constituer le complexe d'amorçage (figure 6.17). Le facteur de transcription SL1 se compose de quatre protomères protéiques dont l'un, contre toute attente, n'est autre que TBP. Le rôle de TBP a été prouvé directement quand on a découvert que chez les levures portant des mutations dans TBP c'est non seulement la transcription par la polymérase II qui est invalidée, mais aussi celle due aux polymérases I et III ; TBP est donc un facteur de transcription universel, essentiel à la transcription par les trois classes d'ARN polymérases. Comme le promoteur des gènes d'ARN ribosomial est dépourvu de boîte TATA,TBP ne s'attache pas à des séquences promotrices particulières, mais son association aux gènes d'ARN ribosomial a lieu *via* une fixation d'autres éléments du complexe SL1 au promoteur, un cas qui rappelle l'attachement des TBP aux séquences Inr des gènes transcrits, malgré l'absence de boîte TATA, par la polymérase II.

Les gènes d'ARNt, d'ARNr 5S et de certains petits ARN impliqués dans l'excision-épissage et le transport de protéines sont transcrits par l'ARN polymérase III. Ces gènes se distinguent par le fait qu'ils siègent au sein des séquences transcrites, et non en amont (figure 6.18). Parmi les gènes trans-

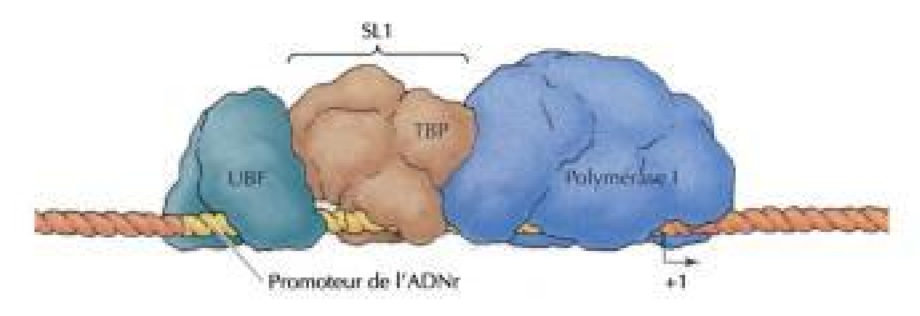


Figure 6.17
Amorçage de la transcription de l'ADNr. Deux facteurs de transcription, UBF et SL1, se lient solidairement au promoteur de l'ADNr et y attirent l'ARN polymérase I en formant le complexe d'amorçage. Un des protomères de SL1 n'est autre que la protéine se fixant à la boîte TATA (TBP).

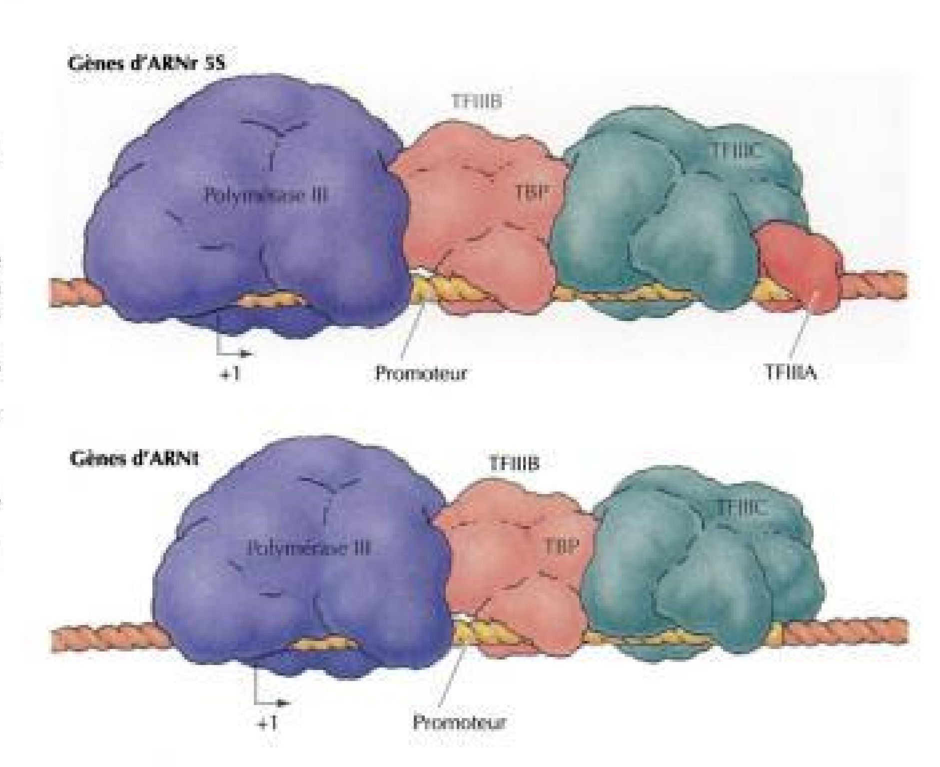
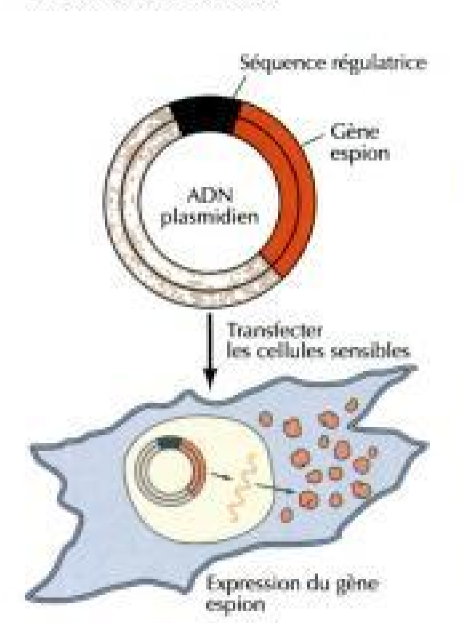


Figure 6.18
Transcription de gènes par l'ARN polymérase III. Les promoteurs des gènes d'ARN 5S et des gènes d'ARNt siègent en aval du site de démarrage de la transcription. La transcription des gènes d'ARN 5S est amorcée par la fixation de TFIIIA, suivie de celle de TFIIIC et TFIIIB que suit l'arrivée de la polymérase. Les promoteurs des gènes d'ARNt sont dépourvus du site accepteur de TFIIIA et TFIIIA n'est pas nécessaire à leur transcription. C'est TFIIIC qui amorce la transcription des gènes d'ARNt, en se liant aux séquences promotrices, suivie de l'arrivée de TFIIIB et de la polymérase. La protéine se fixant à la boîte TATA (TBP) est un protomère de la protéine TFIIIB.

crits par la polymérase III, les mieux connus sont les gènes d'ARNr 5S de xénope. TFIIIA, le premier facteur de transcription qu'on ait purifié, amorce l'assemblage d'un complexe transcriptionnel en s'attachant à des séquences particulières du promoteur de l'ADNr 5S ; cet attachement est suivi de l'attachement de TFIIIC, de TFIIIB, puis de la polymérase. Les promoteurs de gènes d'ARNt diffèrent de ceux des gènes d'ARNr 5S par le fait qu'il leur manque les séquences d'ADN reconnues par TFIIIA ; c'est en effet TFIIIC qui se fixe le premier au promoteur de gènes d'ARNt et qui y attire TFIIIB et la polymérase, pour constituer la machinerie de transcription. TFIIIB comprend plusieurs protomères, dont l'un n'est autre que la protéine se fixant à la boîte TATA (de nouveau, TBP). Le fait que la transcription des gènes propres à la polymérase III exige la présence de TBP a été prouvé directement, rappelons-le, par la découverte de mutants de levure. Bien que les trois ARN polymérases des cellules d'eucaryotes reconnaissent chacune des promoteurs particuliers, il semble donc que TBP soit un élément commun qui lie la reconnaissance du promoteur à l'insertion de la polymérase dans la machinerie de transcription.

Figure 6.19
Identification de séquences régulatrices chez un eucaryote. Dans un plasmide, on lie la séquence régulatrice d'un gène eucaryotique cloné à un gène espion qui code un enzyme aisément détectable. On introduit le plasmide par transfection dans une culture de cellules. Si la séquence régulatrice fonctionne, elle va faire transcrire le gène espion, dont on cherche ensuite l'expression dans les cellules transfectées.



RÉGULATION DE LA TRANSCRIPTION CHEZ LES EUCARYOTES

Bien que la commande de la transcription soit chez les eucaryotes bien plus complexe que chez les bactéries, les principes de bases subsistent ; l'expression des gènes d'eucaryotes est gouvernée en premier lieu au niveau de l'amorçage de la transcription, même si cette dernière est parfois atténuée et rajustée à des étapes ultérieures. Comme c'est le cas chez les bactéries, la transcription dans les cellules d'eucaryotes est gouvernée par des protéines qui s'attachent à des séquences de régulation particulières et modulent l'activité de l'ARN polymérase. La tâche délicate d'ajuster l'expression des gènes des nombreux types cellulaires composant un organisme revient en premier lieu à une action combinée des diverses protéines de régulation de la transcription. En outre, l'empaquetage de l'ADN en chromatine et les modifications que lui font subir les méthylases sont des étapes supplémentaires de complexité inhérentes à la commande de l'expression des gènes d'eucaryotes.



Figure 6.20
Promoteur d'eucaryote. Le promoteur de la thymidine kinase du virus de l'herpès simplex comporte trois éléments de séquence en amont de la boîte TATA, éléments qui sont indispensables à une transcription efficace : une boîte CCAAT et deux boîtes GC (séquence consensus GGGCGG).

Séquences régulatrices agissant en cis : promoteurs et amplificateurs

On a déjà indiqué que la transcription chez les bactéries est commandée par la fixation de protéines aux séquences actives en *cis* (par exemple, l'opérateur *lac*) qui gouvernent la transcription de gènes adjacents. Des séquences régulatrices de même type, actives en *cis*, ajustent l'expression des gènes d'eucaryotes. On en a identifié dans des cellules de mammifère grâce à des transferts de gènes clonés que l'on suspectait être pourvus de régions régulatrices (figure 6.19). Pour ce faire, on attache ces séquences régulatrices potentielles à un gène espion, qui code un enzyme très facile à mettre en évidence ; quand ce gène s'exprime après son transfert à des cellules en culture, on dispose d'un test sensible du pouvoir qu'ont les séquences régulatrices étudiées de commander la transcription. On révèle ainsi les régions biologiquement impliquées dans la régulation et par mutagenèse *in vitro* on trouvera le rôle particulier que jouent certaines séquences singulières de cette région.

Les gènes transcris par l'ARN polymérase II comportent deux éléments promoteurs centraux, la boîte TATA et la séquence Inr, qui sont les sites de fixation particuliers aux facteurs de transcription généraux. D'autres séquences actives en *cis* sont les sites de fixation de tout une série d'autres facteurs de régulation qui commandent l'expression de gènes singuliers ; ces séquences siègent la plupart du temps en amont de la boîte TATA. C'est le cas de deux séquences régulatrices présentes dans beaucoup de gènes d'eucaryotes, qu'on a découvertes en étudiant le promoteur du gène du virus de l'herpès simplex qui code la thymidine kinase (figure 6.20). Ces séquences siègent toutes deux dans la centaine de bases qui précèdent la boîte TATA ; leurs séquences consensus sont CCAAT et GGGCGG (appelé boîte GC). On a depuis lors trouvé des protéines qui se fixent à ces séquences et stimulent la transcription.

Outre la situation relativement simple des boîtes CCAAT et GC appartenant au promoteur de la thymidine kinase de l'herpès, maints gènes de cellules mammaliennes sont gouvernés par des séquences régulatrices placées à grande distance (parfois à plus de 10 kb) du site de démarrage de la transcription. Ces sites appelés **amplificateurs** furent identifiés d'abord par Walter Schaffner en 1981, qui étudiait le promoteur d'un autre virus, SV40 (figure 6.21). Outre une boîte TATA et une série de six boîtes GC, une bonne transcription à partir de ce promoteur exige en plus deux répétitions de 72 pb placées loin en amont ; on s'aperçut que ces séquences stimulaient aussi la transcription de promoteurs autres que ceux de SV40 et, à la grande surprise des expérimentateurs, leur effet ne dépendait ni de leur orientation ni de la distance les séparant du site de démarrage de la transcription (figure 6.22) ; ils stimulaient la transcription, qu'on les place en amont ou en aval du promoteur, et qu'on les insère dans un sens ou dans l'autre.

Le fait que les amplificateurs puissent agir même à grande distance du site de démarrage de la transcription suggéra d'abord qu'ils agissent par un mécanisme différent de celui connu pour les promoteurs, mais cela fut

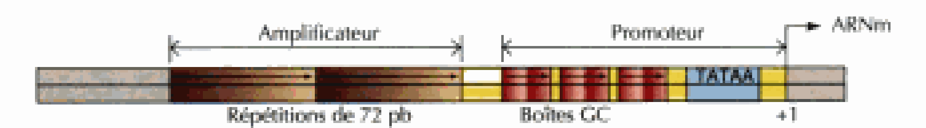


Figure 6.21
Structure de l'amplificateur de SV40. Le promoteur d'expression des gènes précoces de SV40 comporte une boîte TATA et six boîtes GC groupées en trois séries de séquences répétitives. En outre, la transcription n'est efficace qu'à l'intervention d'une séquence amplificatrice amont composée de deux répétitions de 72 paires de bases (bp).

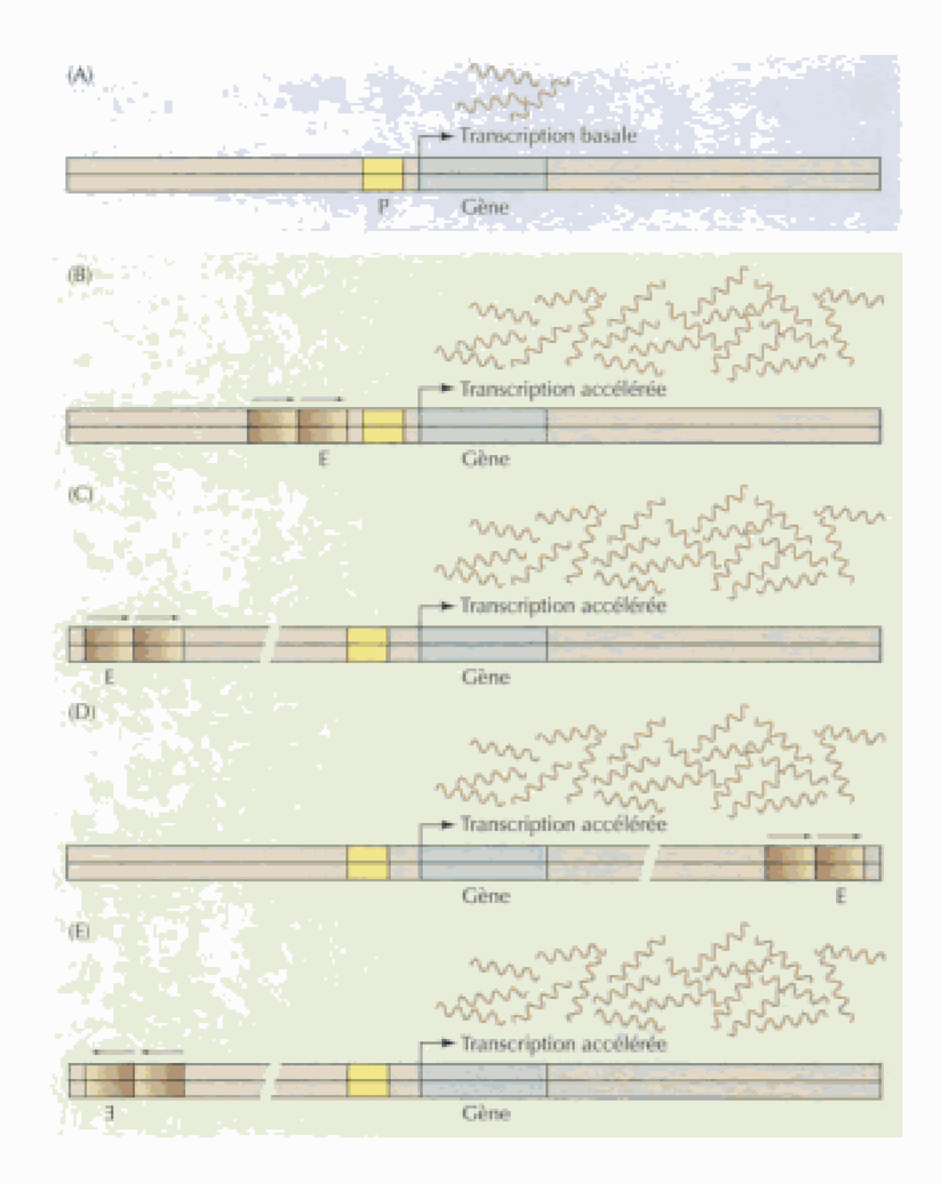


Figure 6.22
Mode d'action d'un amplificateur. En l'absence d'amplificateur, ce gène est transcrit lentement (A). Si on lui ajoute un amplificateur (E), par exemple les répétitions de 72 pb de SV40, on stimule la transcription du gène. L'amplificateur est actif aussi bien quand on l'insère juste en amont du promoteur (B) que quand on l'insère à plusieurs kilobases en amont ou en aval du site de démarrage de la transcription (C et D). En outre, un amplificateur est actif quel que soit le sens dans lequel on l'insère (E).

démenti : comme les promoteurs, les amplificateurs fonctionnent en séquestrant des facteurs de transcription qui modulent l'ARN polymérase. Ceci est dû à ce qu'une fois la molécule d'ADN revenue sur elle-même en formant une boucle, un facteur de transcription fixé à un amplificateur éloigné peut rencontrer la polymérase ou les facteurs de transcription généraux liés au promoteur (figure 6.23) ; comme tout facteur de transcription fixé à un amplificateur éloigné exerce son effet de la même façon que ceux qui sont fixés tout contre le promoteur, il n'existe donc pas de différence notoire entre l'influence d'un amplificateur et celle d'une séquence régulatrice active en *cis* et voisine du site de démarrage de la transcription. Notons que si on découvrit les amplificateurs d'abord dans les cellules de mammifères, on en a retrouvé ensuite chez des bactéries, un cas exceptionnel où des résultats acquis chez des eucaryotes servirent de modèle pour les systèmes plus simples des procaryotes.

La fixation, à un amplificateur, de régulateurs transcriptionnels protéiques particuliers permet de commander l'expression génique au cours du développement embryonnaire et de la différenciation cellulaire, comme le font les hormones et les facteurs de croissance. Un des amplificateurs de mammifère bien connu module la transcription de gènes d'immunoglobuline dans les lymphocytes B. Par des transferts de gène *in vitro*, on a montré que l'ampli-

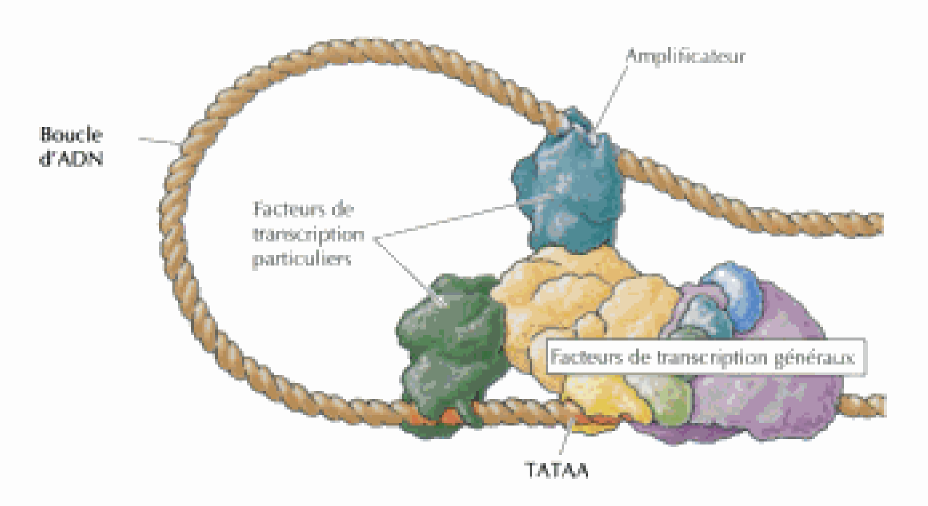


Figure 6.23
ADN recourbé en boucle. Des facteurs de transcription fixés sur divers amplificateurs éloignés peuvent entrer en contact avec des facteurs de transcription généraux liés au promoteur parce que le fragment d'ADN qui les sépare revient sur lui-même en formant une boucle. Aussi l'influence de facteurs de transcription liés à l'ADN juste en amont d'un promoteur ne diffère-t-elle pas notablement de celle exercée par un amplificateur éloigné.

ficateur des immunoglobulines agit dans les lymphocytes, mais pas dans les autres types de cellules ; cette séquence régulatrice est donc responsable au moins en partie de l'expression des gènes d'immunoglobuline par un type cellulaire singulier, arrivé à l'état de différenciation approprié.

Un trait notoire des amplificateurs est qu'ils comportent en général plusieurs éléments de séquence fonctionnels, fixant chacun son propre régulateur transcriptionnel protéique ; plusieurs protéines collaborent à la régulation d'un gène. L'amplificateur de la grande chaîne des immunoglobulines, par exemple, occupe environ 200 paires de bases et comporte au moins neuf éléments de séquence distincts qui attirent des protéines (figure 6.24). Il suffit de muter la première venue de ces séquences pour réduire, mais sans l'abolir, le pouvoir amplificateur, ce qui prouve que l'effet stimulateur de chaque protéine liée à l'amplificateur est au moins en partie redondant. La plupart des éléments de séquence composant l'amplificateur des immunoglobulines pris un à un stimulent la transcription dans des cellules autres que les lymphocytes. La spécificité de l'amplificateur natif envers le lymphocyte B ne dépend pas de la spécificité fonctionnelle de chacun de ses composants envers un tissu particulier ; c'est plutôt l'expression spécifique à un tissu qui résulte de la combinaison des divers éléments de séquence qui composent l'amplificateur natif. Parmi ces éléments, se trouvent des séquences régulatrices actives en *cis*, qui attirent des activateurs transcriptionnels exprimés de façon spécifique dans les lymphocytes B ainsi que d'autres séquences régulatrices qui, dans des cellules autres que des lymphocytes, fixent des répresseurs. À côté d'éléments régulateurs qui inhibent la transcription dans les types de cellules inappropriés, l'amplificateur des immunoglobulines comporte donc des éléments régulateurs qui activent la transcription dans les lymphocytes B. Comme l'activité globale de l'amplificateur dépasse la somme de celle de ses parties, l'effet des diverses protéines liées à chacun des éléments de séquences est un effet concerté.

Protéines aux commandes de la transcription

On a isolé une série de protéines régulatrices de la transcription en se basant sur leur propriété de se lier à des séquences promotrices ou amplificatrices ; pour suivre cette propriété, on a mis au point deux types d'expériences. La



Figure 6.24
Structure de l'amplificateur des immunoglobulines. L'amplificateur de la chaîne lourde d'immunoglobuline s'étend sur environ 200 bases et comporte neuf éléments de séquences fonctionnels (E, μE1 à 5, π, μB et OCT) qui accélèrent la transcription dans les lymphocytes B.

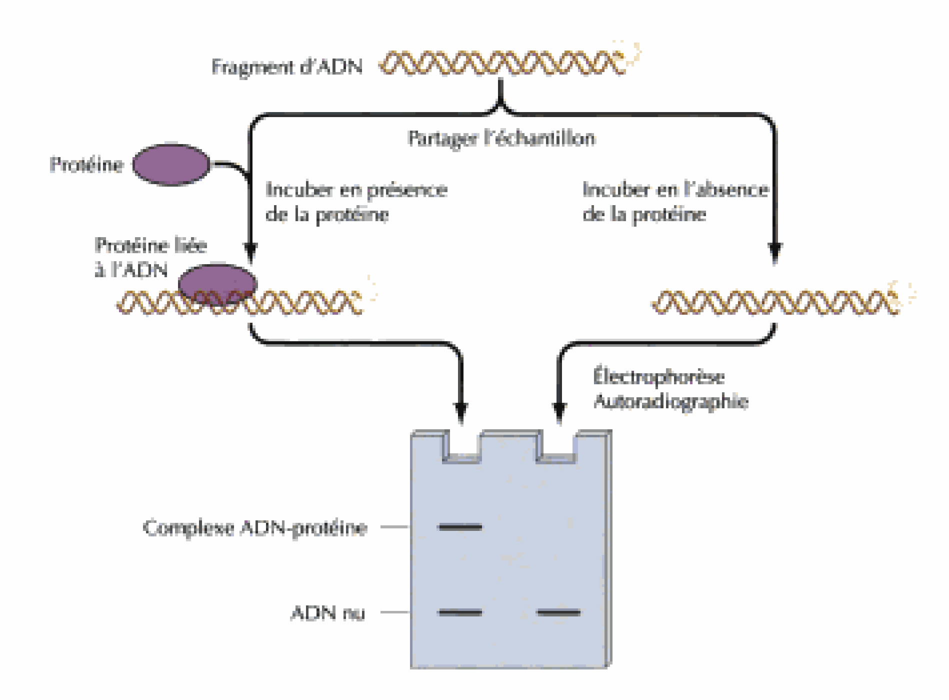


Figure 6.25
Test de ralentissement de mobilité électrophorétique. On partage en deux aliquots un échantillon contenant un fragment d'ADN radiomarqué et on incube un des aliquots en présence d'une protéine qui se fixe à une séquence singulière de cet ADN. On procède à l'électrophorèse de ces deux aliquots, dans un gel non dénaturant, de façon que la protéine reste fixée à l'ADN. Si l'ADN de l'aliquot incubé en présence de la protéine migre moins vite que l'ADN nu, c'est que la protéine s'est attachée à l'ADN ; seule une partie de l'ADN de l'échantillon a fixé la protéine de sorte que le milieu d'incubation contient à la fois des complexes ADN-protéine et de l'ADN nu.

première n'est autre que la prise d'empreintes, déjà décrite pour vérifier la fixation de la polymérase aux promoteurs procaryotiques (voir figure 6.3). La seconde est le **freinage électrophorétique** : on incube un fragment d'ADN radiomarqué en présence de l'extrait de protéines, puis on soumet le tout à une électrophorèse en conditions non dénaturantes (figure 6.25). Si une protéine s'est fixée à une séquence d'ADN, elle en décroît la mobilité électrophorétique, puisqu'elle en augmente la taille. En combinant la prise d'empreintes au freinage électrophorétique, on a prouvé que les sites fixant les protéines actives correspondaient précisément aux éléments régulateurs des promoteurs et des amplificateurs, autrement dit que ces séquences sont les sites reconnus par les protéines se fixant spécifiquement à l'ADN.

L'un des prototypes de facteurs de transcription eucaryotique fut découvert par Robert Tjian et ses collaborateurs en étudiant la transcription de l'ADN de SV40. Ils remarquèrent qu'un facteur appelé ensuite Sp1 (pour *specific protein 1*) stimulait la transcription à partir du promoteur de SV40, mais pas à partir de plusieurs autres promoteurs dans des extraits acellulaires ; plus tard, ils observèrent que cette stimulation dépendait de la présence de boîtes GC dans le promoteur de SV40. Si on excise ces séquences, Sp1 perd son effet stimulant. La prise d'empreintes révéla que Sp1 se fixe spécifi-

Tableau 6.2 Quelques facteurs de transcription et l'endroit où ils se lient à l'ADN

Facteur de transcription	Site de fixation consensus
Protéine spécifique 1 (Sp1)	GGGCGG
Protéine se liant à CCAAT et à l'amplificateur (C/EBP)	CCAAT
Protéine activatrice 1 (AP1)	TGACTCA
Protéine se fixant aux octamères (OCT-1 et OCT-2)	ATGCAAAT
Protéines se fixant à la boîte E (E12, E47, E2-2)	CANNTG[a]

[a] N symbolise n'importe quel nucléotide.

quement aux séquences des boîtes GC. L'ensemble de ces résultats prouve que les boîtes GC sont le site de fixation électif d'un activateur de transcription, Sp1. Des expériences semblables ont établi que beaucoup d'autres séquences régulatrices de la transcription, notamment les séquences CCAAT ainsi que les divers éléments de séquence de l'amplificateur des immunoglobulines, sont aussi des sites reconnus par des protéines qui se fixent à des séquences d'ADN singulières (tableau 6.2).

L'attachement sélectif de Sp1 à la boîte GC n'a pas seulement démontré l'effet de Sp1 en tant que facteur de transcription spécifique d'une séquence, mais a aussi suggéré une approche générale du problème de la purification des facteurs de transcription. L'isolement de ces protéines soulevait auparavant un problème redoutable, car elles sont présentes en si petite quantité (par exemple de l'ordre de 0,001 % du taux total de protéines cellulaires) qu'on n'arrive pas à les purifier par les méthodes biochimiques habituelles. On résolut ce problème en purifiant Sp1 par **chromatographie d'affinité sur ADN** (figure 6.26). Pour ce faire, on attacha de nombreux exemplaires d'un oligonucléotide pourvu des séquences de la boîte GC à un support solide et on déposa des extraits cellulaires sur une colonne remplie de ce matériau. Comme Sp1 se fixe à la boîte GC avec une affinité élevée, il reste fixé à la colonne pendant que les autres protéines en sont éliminées ; on élua ensuite une Sp1 de haute pureté, qui servit à déterminer sa séquence d'acides aminés, laquelle permit de cloner le gène de Sp1.

La chromatographie d'affinité sur ADN, appliquée d'abord pour purifier Sp1, a servi à isoler, à partir de cellules d'eucaryotes, tout une série protéines se fixant à une séquence d'ADN singulière. Une fois une de ces protéines

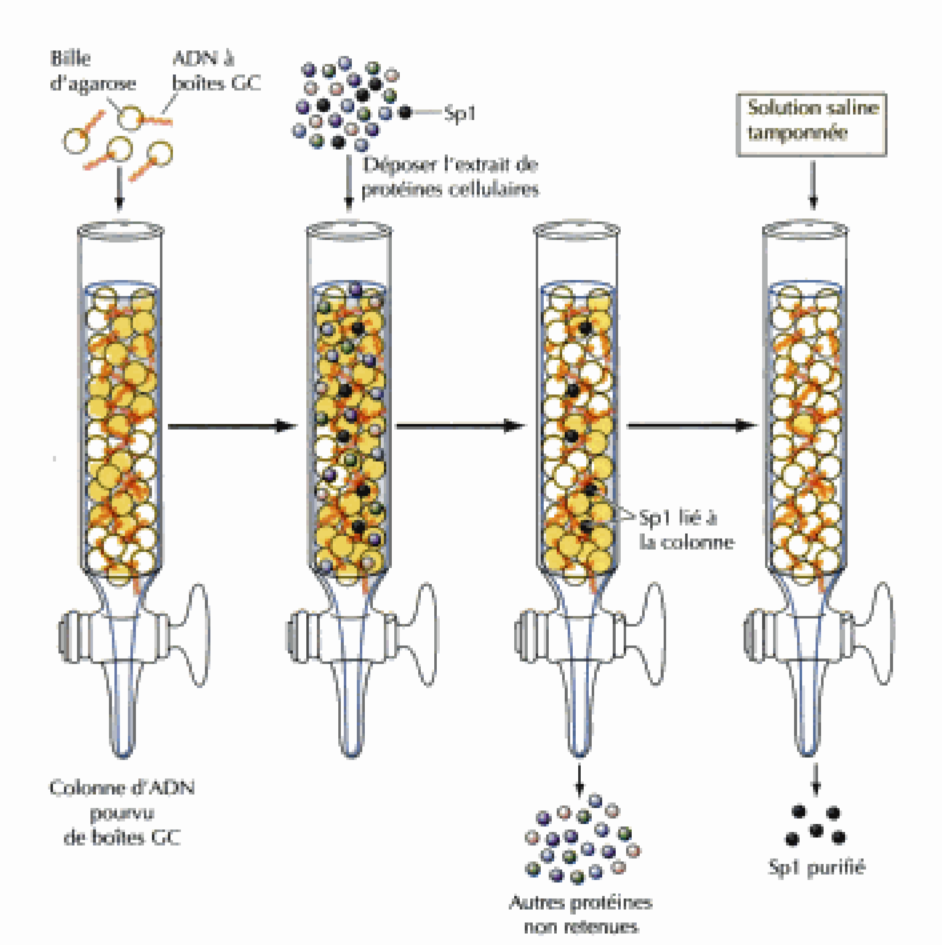


Figure 6.26
Purification de Sp1 par chromatographie d'affinité sur ADN. À des billes d'agarose, on attache par covalence un oligonucléotide bicaténaire comportant une série de boîtes GC, puis on monte avec ces billes une colonne de chromatographie sur laquelle on dépose un mélange de protéines cellulaires contenant Sp1. Comme Sp1 s'attache sélectivement à l'oligonucléotide comportant les boîtes GC, il reste sur la colonne, tandis que les autres protéines en sont éliminées. Il suffit de faire passer sur la colonne un tampon de forte concentration saline pour que Sp1 se dissocie des boîtes GC de l'ADN et soit isolé à l'état pur.

EXPÉRIENCE CLÉ

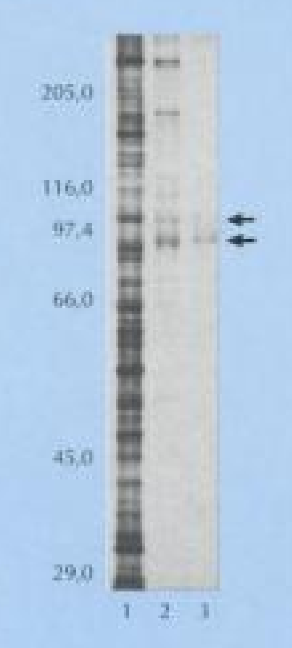


Purification d'un facteur de transcription eucaryotique

Purification par affinité de protéines se fixant à des séquences spécifiques d'ADN

James T. Kadonaga et Robert Tjian
University of California, Berkeley

Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 1986, Volume 83, pages 5889–5893



Purification de Sp1. Électrophorégramme sur gel des protéines présentes dans l'extrait nucléaire brut (piste 1) et des protéines obtenues après un et deux cycles de chromatographie d'affinité sur ADN ; (pistes 2 et 3, respectivement). À gauche, on a indiqué la taille des marqueurs protéiques (en kilodaltons) et les polypeptides Sp1 par des flèches.

Contexte

Depuis les travaux de Jacob, Monod et Lwoff sur l'opéron *lac*, on admettait que la transcription était modulée par des protéines qui se fixent à des séquences particulières de l'ADN. Un des prototypes expérimentaux choisi pour étudier l'expression des gènes d'eucaryotes était le virus simien SV40, dont on avait identifié plusieurs séquences d'ADN régulatrices au début des années '80. En 1983, William Dynan et Robert Tjian découvrirent qu'un de ces modules de séquence (la boîte GC) est le site de liaison électif d'une protéine présente dans les extraits nucléaires de cellules humaines. Cette protéine (appelée Sp1 pour *specific protein 1*) non seulement se fixe à la séquence de la boîte GC, mais stimule la transcription *in vitro*, preuve qu'elle est un activateur de transcription reconnaissant une séquence singulière.

Pour saisir le mécanisme d'action de Sp1, il fallait en obtenir une préparation pure et ensuite cloner le gène de la protéine. Il devint impérieux de purifier la protéine Sp1, une tâche bien délicate avec la technologie biochimique disponible à cette époque, car Sp1 et les autres facteurs de transcription ne comptent pas pour plus de 0,001 % de la masse totale des protéines cellulaires. James Kadonaga et Robert Tjian résolurent ce problème en mettant au point une méthode par chromatographie d'affinité envers l'ADN, qui réussit à purifier non seulement Sp1, mais aussi bon nombre d'autres facteurs de transcription d'eucaryotes, ouvrant ainsi l'ère de l'analyse moléculaire de la régulation transcriptionnelle chez les eucaryotes.

Preuve expérimentale

La méthode de chromatographie d'affinité sur ADN mise au point par Kadonaga et Tjian tirait profit de la haute affinité de liaison que manifestait Sp1 envers la séquence GGGCGG de la boîte GC. Ils couplèrent des oligonucléotides synthétiques pourvus d'une série de ces séquences à des billes solides, en firent une colonne et y déposèrent un extrait nucléaire brut ; ils firent passer un tampon sur la colonne de façon à éliminer les protéines non retenues par les oligonucléotides, puis firent passer sur les billes une solution saline concentrée (0,5 M KCl) tamponnée, destinée à rompre la liaison de Sp1 à l'ADN et à libérer Sp1.

L'électrophorèse sur gel montra que l'extrait nucléaire déposé sur la colonne contenait un mélange complexe de protéines (voir la figure), mais que 90 % des protéines éluées de la colonne d'affinité sur ADN ne contenait plus, après deux passages sur ce type de colonne, que deux polypeptides, identifiés à Sp1 par épreuve de fixation à l'ADN et accélération de la trans-

obtenue à l'état pur, on pouvait cloner son gène et connaître sa séquence nucléotidique, source d'information primordiale sur la structure et le fonctionnement de ces importantes protéines de régulation.

Structure et fonction des activateurs de transcription

Comme les facteurs de transcription sont la clé de voûte de la régulation de l'expression génique, les biologistes moléculaires et cellulaires se sont attachés à comprendre leur mode d'action. Parmi ces protéines, les mieux étu-

Purification d'un facteur de transcription eucaryotique (suite)

cription *in vitro*. Il était donc possible d'obtenir Sp1 à l'état pur par chromatographie d'affinité sur de l'ADN.

Portée de la découverte

Dans la publication de 1986, Kadonaga et Tjian affirmaient que « la méthode de purification par chromatographie d'affinité sur ADN allait permettre de purifier d'autres protéines se fixant à des séquences d'ADN particulières ». Cette prédiction s'est vérifiée, car ce fut le moyen de purifier beaucoup de facteurs de transcription. Les gènes codant d'autres facteurs de transcription furent isolés par une autre méthode (mise au point séparément par Philip Sharp et Steven Mc Knight) dans laquelle on crible des librairies d'expression d'ADNc avec des sondes oligonucléotidiques en cherchant les protéines recombinantes qui se fixent spécifiquement aux séquences d'ADN désirées. Le fait de réussir à isoler des protéines se fixant à des séquences singulières d'ADN a permis de caractériser en détail la structure et la fonction de tout une série de protéines en jeu dans la régulation transcriptionnelle, base indispensable pour saisir l'expression d'un gène d'eucaryote.



Robert Tjian

diés sont les **activateurs de transcription** qui, comme Sp1, se fixent à des séquences d'ADN modulatrices et stimulent la transcription. On s'est aperçu que ces facteurs comportent en général deux domaines, un qui s'attache spécifiquement à l'ADN, l'autre (le domaine activateur) qui accélère la transcription en entrant en interaction avec d'autres éléments de la machinerie transcriptionnelle (figure 6.27). On a remarqué que ces activateurs de transcription sont des protéines modulaires, c'est-à-dire qu'il est possible d'échanger, par les méthodes de recombinaison d'ADN, le domaine de fixation à l'ADN et le domaine activateur d'un facteur avec ceux d'un autre facteur. Ces manipulations fournissent des facteurs de transcription hybrides, qui activent la transcription en s'attachant à des séquences promotrices ou amplificatrices déterminées par la spécificité de leur domaines reconnaissant l'ADN ; le rôle du domaine se fixant à l'ADN est donc d'ancrer le facteur de transcription au site adéquat de l'ADN ; le domaine d'activation, lui, par son interaction avec d'autres protéines, stimule la transcription de façon indépendante.

À présent, nombreux sont les facteurs de transcription trouvés dans les cellules d'eucaryotes, ce qui n'est pas surprenant, étant donné que les gènes des organismes pluricellulaires s'expriment de manière très élaborée, puisque particulière à chaque tissu et à chaque étape du cycle cellulaire.

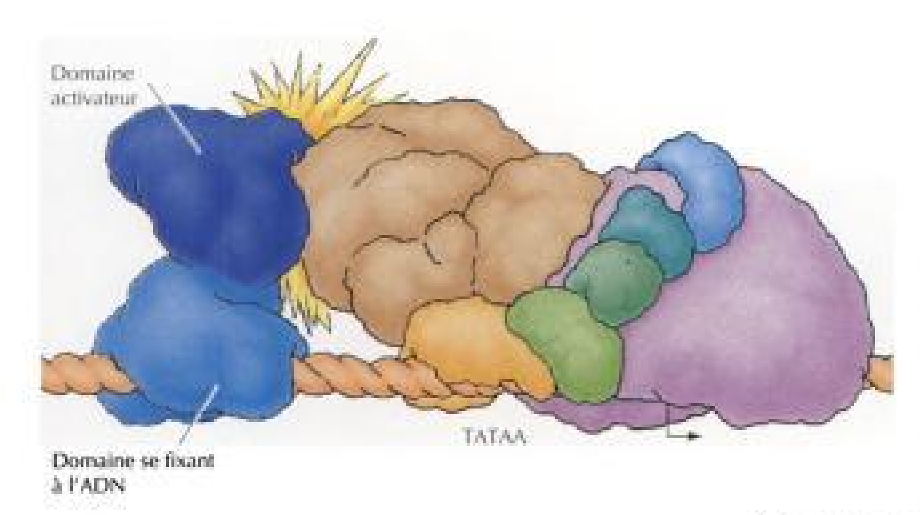
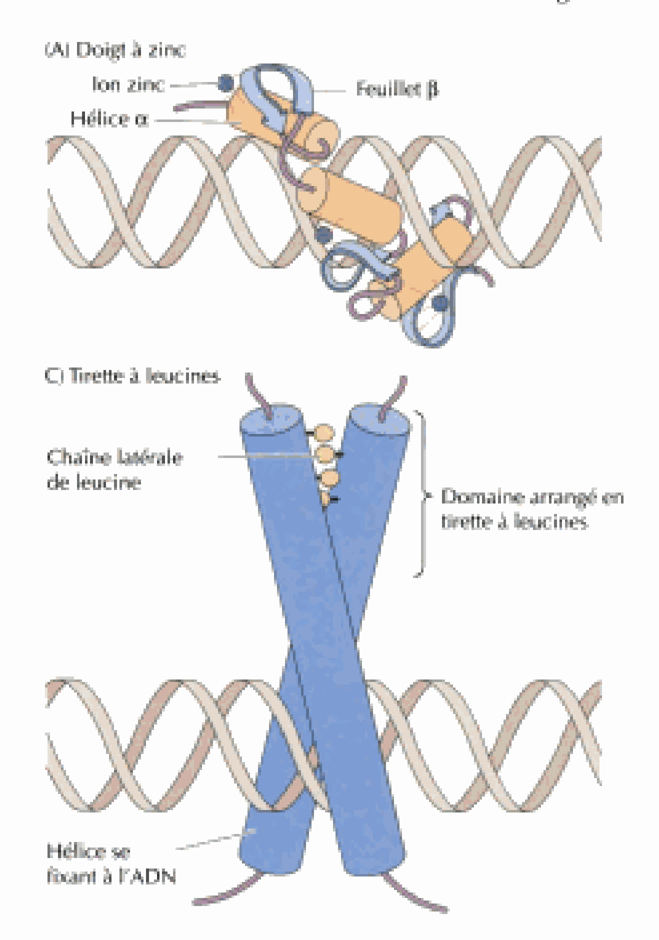


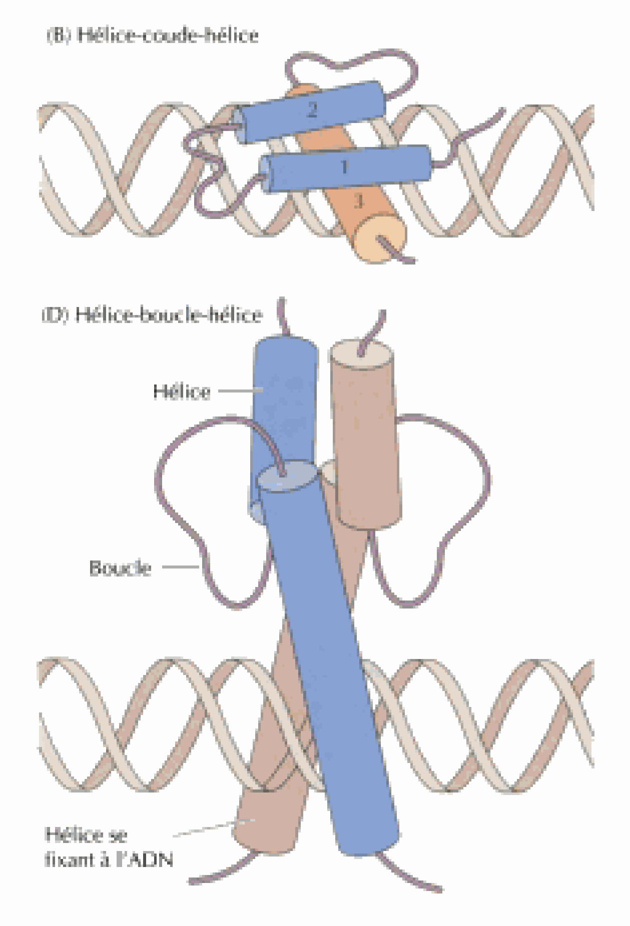
Figure 6.27
Structure d'un activateur de transcription. Les activateurs de transcription comportent deux domaines séparés, un domaine se fixant à l'ADN, qui y reconnaît une séquence d'ADN particulière, et un domaine activateur qui entre en contact avec d'autres composants de la machinerie de transcription.

Figure 6.28
Familles de domaines se fixant à l'ADN. (A) Un domaine en doigt à zinc comporte une boucle dans laquelle une hélice α et un feuillet β coopèrent pour fixer un ion zinc. (B) Un domaine en hélice-coude-hélice comporte trois, parfois quatre, régions hélicoïdales ; l'une d'elles, l'hélice 3, partage le plus grand nombre de contacts avec l'ADN, tandis que les hélices 1 et 2 couvrent l'ensemble et stabilisent l'interaction. (C) Le domaine de fixation à l'ADN des protéines à tirette à leucines est formé de deux chaînes polypeptidiques distinctes ; leur dimérisation est due aux interactions entre les chaînes hydrophobes de leucine concentrées sur un côté de l'hélice (la tirette à leucines) ; celle-ci est directement adjacente à une hélice se fixant à l'ADN, hélice enrichie en résidus d'acide aminé basiques. (D) Un domaine en hélice-boucle-hélice ressemble à un domaine pourvu d'une tirette à leucines, sauf que chaque domaine de dimérisation de cette protéine comporte non pas une, mais deux hélices, séparées par une boucle.

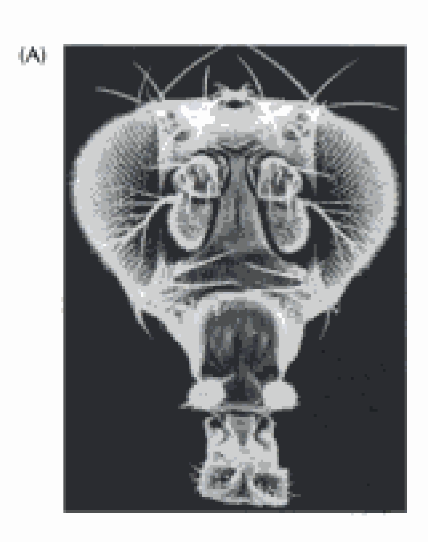
La dissection moléculaire a montré la parenté des domaines se fixant à l'ADN de beaucoup de ces protéines (figure 6.28). Les **domaines en doigt à zinc** comportent des répétitions de résidus cystéine et histidine qui lient les ions zinc et se replient en boucles (doigts) qui s'attachent à l'ADN ; on identifia d'abord de tels domaines dans un facteur de transcription en rapport avec l'ARN polymérase III, TFIIIA, mais il en existe beaucoup parmi les facteurs de transcription qui ajustent les promoteurs d'ARN polymérase II, notamment Sp1. Parmi les autres facteurs de transcription à domaine en doigt à zinc, citons les **récepteurs d'hormones stéroïdes**, qui commandent la transcription de gènes en réponse à des hormones telles que les œstrogènes et la testostérone.

Le motif **hélice-coude-hélice** fut découvert dans des protéines de procaryotes se fixant à l'ADN, par exemple la protéine activant le catabolisme (CAP) de *E. coli*. Dans ces protéines, une hélice particulière engage la majorité des contacts avec la molécule d'ADN, tandis que les autres hélices couvrent ce complexe pour en stabiliser les interactions. Dans les cellules d'eucaryotes, appartiennent aux protéines à domaine en hélice-coude-hélice les protéines à **homéodomaine**, qui jouent un rôle clé dans la régulation de l'expression des gènes au cours du développement embryonnaire. On découvrit les gènes codant ces protéines chez des mutants de drosophile à embryogenèse aberrante ; parmi les mutations de ce type chez *Drosophila*, les premières décrites (appelées mutations homéotiques en 1894) aboutissaient à transformer une partie du corps en une autre ; chez le mutant homéotique *Antennapedia* par exemple, ce ne sont plus des antennes, mais des pattes qui croissent sur la tête (figure 6.29). L'analyse génétique de ces mutants, accomplie par Ed Lewis dans les années '40, montra que la drosophile possède neuf gènes homéotiques, chacun spécifiant un segment particulier de l'or-





(A)



(B)

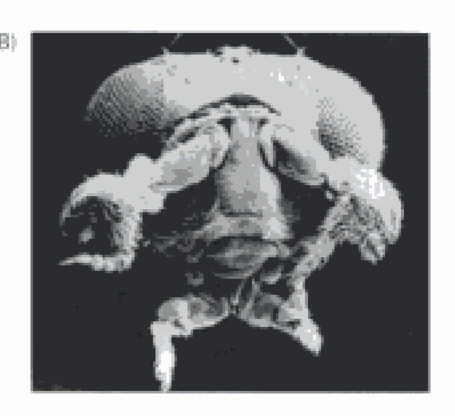


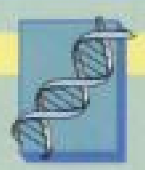
Figure 6.29
Mutation *Antennapedia*. Les mouches mutées dans le gène *Antennapedia* portent des pattes au lieu d'antennes sur leur tête. (A) Tête de mouche normale. (B) Tête de mutant *Antennapedia*. (D'après Kaufman *et al.*, 1990, *Adv. Genet.* **27** :309 ; aimablement communiqué par T. C. Kaufman.)

ganisme. Le clonage et l'analyse moléculaire de ces gènes révéla qu'ils comportent des séquences conservées de 180 paires de bases (appelées **homéoboîtes**) codant les domaines de fixation à l'ADN (homéodomaines) de certains facteurs de transcription. On a trouvé à ce jour tout une série d'autres protéines à homéodomaine tant chez les champignons et les plantes que chez d'autres animaux, dont l'Homme. Chez les vertébrés, les gènes homéotiques ressemblent de près à ceux de la drosophile, tant par leur structure que par leur fonction, preuve de la longue survivance de ces facteurs de transcription du développement embryonnaire.

Deux autres familles de protéines se fixant à l'ADN, les protéines à **tirette à leucines** et les protéines à **hélice-boucle-hélice**, comportent des domaines de fixation à l'ADN constitués par accolement de deux chaînes polypeptidiques. La tirette à leucines comporte quatre ou cinq résidus leucine séparés par des intervalles de 7 résidus, ce qui aboutit à placer les chaînes hydrophobes d'un seul côté de l'hélice ; cette région sert de domaine de dimérisation aux deux protomères protéiques, maintenus par les interactions hydrophobes entre les chaînes latérales de leurs résidus leucine. Juste à côté de la tirette à leucines se trouve une région riche en résidus chargés positivement (lysine et arginine), qui s'attache à l'ADN. La structure des protéines à hélice-boucle-hélice ressemble assez bien à celle des protéines à tirette à leucines, sauf que chaque domaine d'un protomère s'accole à son semblable par deux régions hélicoïdales séparées par une boucle. Un trait marquant des facteurs de transcription pourvus d'une tirette à leucine et de ceux pourvus d'un module hélice-boucle-hélice est que certains membres de cette famille forment des dimères avec d'autres membres ; la combinaison de protomères protéiques distincts génère un large éventail de facteurs qui diffèrent tant par leur séquence reconnaissant l'ADN que par leur pouvoir de stimuler la transcription. Les protéines pourvues d'une tirette à leucines et celles pourvues d'un motif hélice-boucle-hélice ont un rôle important à jouer dans la régulation de l'expression de la spécificité tissulaire et des gènes inductibles, et la formation d'hétérodimères entre membres différents de ces familles est un aspect crucial de l'ajustement de leur fonction.

Le domaine activateur des facteurs de transcription est moins bien connu que leurs domaines de fixation à l'ADN. Certains, baptisés domaines d'activation acides, sont enrichis en résidus de charge négative (aspartate et glutamate), d'autres sont enrichis en résidus proline et glutamine. On pense que ces domaines activateurs stimulent la transcription en s'associant à des facteurs de transcription généraux, tels TFIIB et TFIID, pour accélérer l'assemblage du complexe de transcription sur le promoteur ; on a montré que le

MÉDECINE MOLÉCULAIRE



Facteur de transcription Pit-1 et déficience en hormone de croissance

Pathogénie

L'hormone de croissance, une protéine sécrétée par l'hypophyse, est indispensable à la croissance et au développement de l'individu : un nouveau-né sur 5 à 10 mille produit une faible quantité d'hormone de croissance et n'atteindra qu'une taille réduite à l'âge adulte (nanisme hypophysaire). Cette déficience en hormone de croissance provient de diverses causes, notamment de mutations congénitales dans les gènes impliqués dans la sécrétion de l'hormone ; certains enfants ne sont pas seulement déficients en hormone de croissance, mais aussi en d'autres hormones produites par l'hypophyse, par exemple l'hormone thyréostimulante (TSH), l'hormone adrénocorticotrope (ACTH), les gonadotrophines et la prolactine. Parmi ces patients, un groupe bien caractérisé est déficient en hormone de croissance, hormone thyréostimulante et prolactine, mais produit les autres hormones hypophysaires à taux normal.

Bases moléculaire et cellulaire

Le déficit humain combiné en hormone de croissance, hormone thyréostimulante et prolactine ressemble de près au phénotype de certaines souches naines de souris. On avait observé que ces souris naines étaient dépourvues de cellules hypophysaires spécialisées dans la sécrétion d'hormone de croissance, d'hormone thyréostimulante et de prolactine (appelées somatotropes, thyréotropes et lactotropes). En 1990, on s'aperçut que ces déficiences étaient dues à des mutations dans le gène codant le facteur de transcription Pit-1 ; deux groupes de chercheurs retrouvèrent ensuite chez l'Homme ces mutations de Pit-1 qui entraînent une déficience combinée en hormone de croissance, hormone thyréostimulante et prolactine. L'analyse moléculaire de Pit-1 a révélé que cette protéine comporte un homéodomaine impliqué dans la transcription des gènes d'hormone de croissance et de prolactine ainsi que dans la différenciation de cellules somatotropes, thyréotropes et lactotropes au cours du développement embryonnaire de l'hypophyse.

Prévention et traitement

Le traitement des enfants déficients en hormone de croissance par des injections de cette hormone est bénéfique. Jusqu'à il y a peu, on ne pouvait obtenir cette hormone qu'à partir de cerveaux humains, disponibles en quantité insuffisante. En 1979, on put faire exprimer l'ADNc de cette hormone par *E. coli* ; l'emploi en médecine humaine de cette hormone recombinante reçu l'approbation des autorités en 1985 et on commença à traiter les cas de nanisme hypophysaire avec cette hormone d'origine humaine. Quand le déficit en hormone de croissance résulte d'une mutation congénitale, le criblage génétique des suspects permet d'en faire le diagnostic précoce et de traiter les enfants touchés.

Référence

Parks, J. S. *et al.* (1993) Genetics of growth hormone gene expression. *Hormone Res.* **40** :54-61.



Individu de taille normale (le directeur de cirque P. T. Barnum) à côté d'un autre atteint de nanisme hypophysaire, présenté comme vedette du cirque sous le nom de Tom-Pouce. (Bettmann Archive, Inc.)

domaine activateur de plusieurs facteurs de transcription (dont Sp1) entrait en interaction avec TFIID *via* sa fixation à des facteurs associés à TBP (TAF)(figure 6.30). Une caractéristique importante de ces interactions est que divers activateurs se lient à une série de facteurs de transcription généraux ou de TAF, un mécanisme qui nous permet d'entrevoir comment l'action combinée de divers facteurs accélère la transcription de façon concertée, clé de voûte de la régulation transcriptionnelle dans les cellules d'eucaryotes.

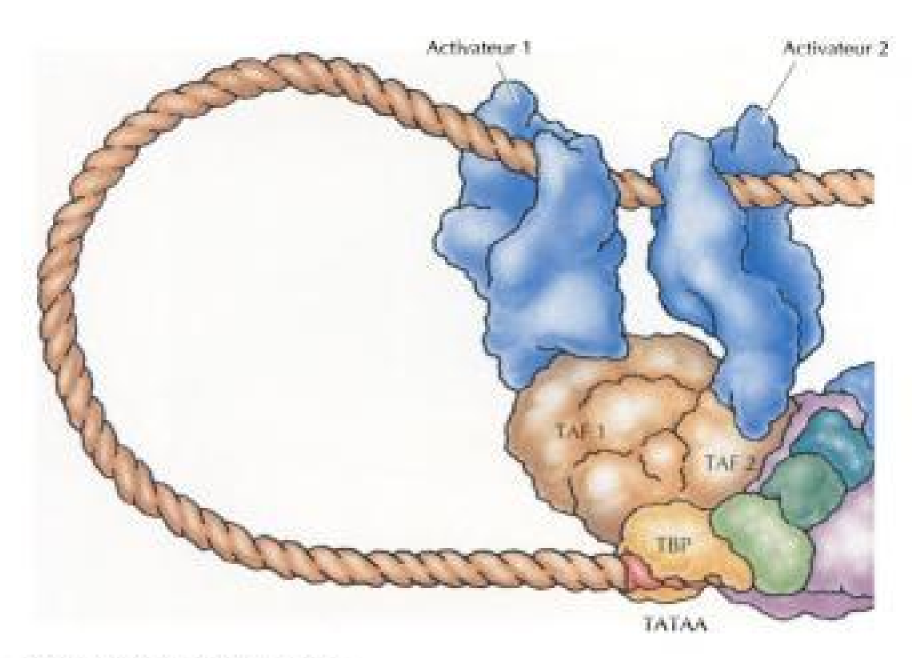


Figure 6.30
Synergie entre activateurs transcriptionnels. Plusieurs activateurs de transcription vont s'associer au facteur de transcription général TFIID par le truchement de divers TAF.

Répresseurs eucaryotiques

L'expression des gènes chez les eucaryotes est modulée aussi bien par des répresseurs que par des activateurs de transcription. Comme il arrive pour leurs correspondants procaryotiques, les répresseurs d'eucaryotes s'attachent à des séquences d'ADN particulières et inhibent la transcription ; certains répresseurs ne font qu'interférer avec la fixation à l'ADN d'autres facteurs de transcription (figure 6.31). Quand, par exemple, un répresseur s'attache au voisinage du site de démarrage de la transcription, il empêche le contact de l'ARN polymérase ou des facteurs de transcription généraux avec le promoteur, un effet qui rappelle le rôle des répresseurs bactériens. D'autres répresseurs entrent en compétition avec des activateurs pour des séquences régulatrices particulières ; certains de ces répresseurs comportent le même domaine de fixation à l'ADN qu'un activateur donné, mais, étant dépourvus de domaine activateur, leur attachement à un promoteur ou à un amplificateur empêche que l'activateur compétent vienne se fixer et, ce faisant, que la transcription démarre.

Contrairement à ceux qui ne font qu'interférer avec la fixation des activateurs, maints répresseurs (appelés répresseurs actifs) possèdent un domaine fonctionnel singulier qui inhibe la transcription *via* des interactions entre protéines (figure 6.31B). On décrivit le premier répresseur de ce type en 1990, en étudiant un gène désigné *Krüppel*, en jeu dans le développement embryonnaire de la drosophile ; l'étude moléculaire de la protéine Krüppel révéla qu'elle comportait un domaine répresseur bien séparé, relié à un domaine en doigt à zinc se fixant à l'ADN. On pouvait échanger ce domaine répresseur de Krüppel avec les domaines se fixant à l'ADN faisant partie d'autres facteurs de transcription ; ces molécules hybrides réprimaient aussi la transcription, preuve que le domaine répresseur de Krüppel inhibait la transcription *via* des interactions entre protéines, quel que soit son site de fixation à l'ADN.

On a maintenant la preuve que beaucoup de répresseurs actifs jouent un rôle crucial dans la régulation transcriptionnelle des cellules animales, bien souvent comme régulateurs clé de la prolifération et de la différenciation cellulaires. Comme cela s'est passé pour les activateurs de transcription, on a identifié plusieurs types de domaines répresseurs ; celui de Krüppel, par exemple, est enrichi en résidus alanine, tandis que d'autres le sont en proline ou en résidus acides. Les cibles physiologiques des répresseurs sont

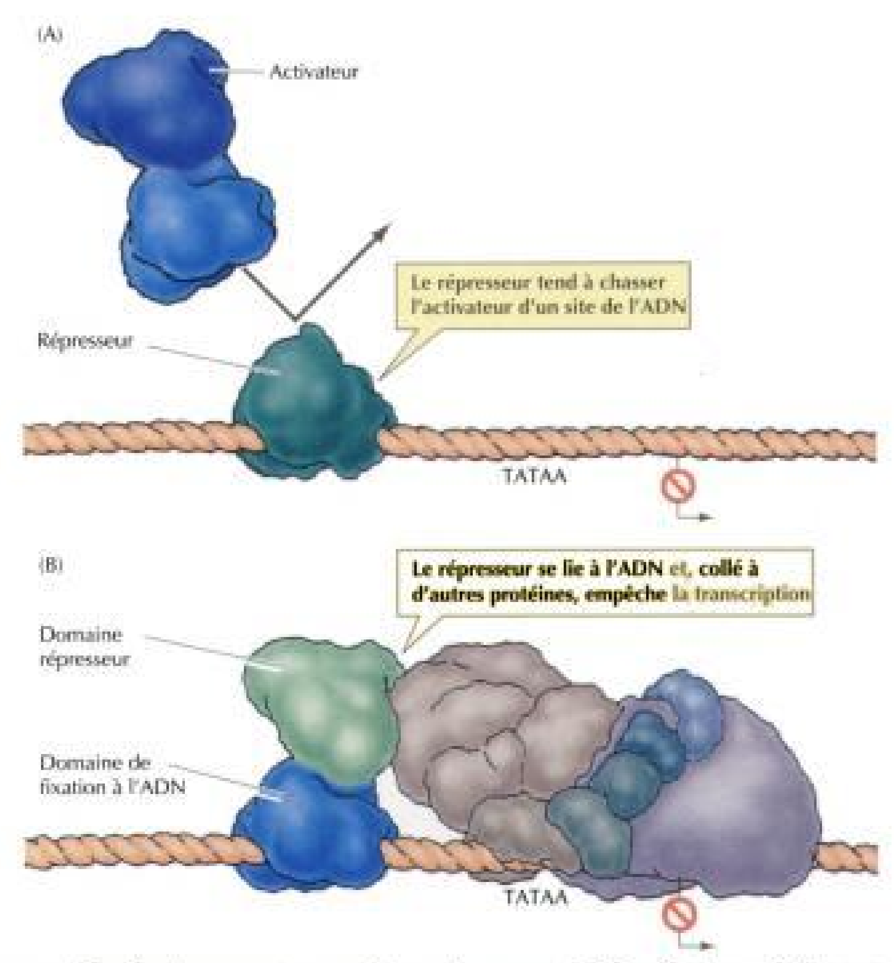


Figure 6.31
Effet d'un répresseur eucaryotique. (A) Certains répresseurs empêchent physiquement les activateurs de se fixer aux séquences régulatrices. (B) D'autres possèdent des domaines répresseurs actifs qui inhibent la transcription par leur accolement à des facteurs de transcription généraux.

aussi de plusieurs espèces ; certains répresseurs inhibent la transcription en entrant en contact avec des facteurs de transcription généraux comme TFIID, d'autres, semble-t-il, avec des protéines d'activation particulières.

La contribution de répresseurs ainsi que d'activateurs à la modulation transcriptionnelle élargit considérablement l'éventail des mécanismes qui pilotent l'expression des gènes d'eucaryotes. Un rôle important des répresseurs serait d'inhiber l'expression de gènes particuliers à un tissu dans des types cellulaires inappropriés ; souvenons-nous, par exemple, qu'un site de fixation de répresseur porté par l'amplificateur du gène de chaîne lourde des immunoglobulines déterminerait la spécificité tissulaire en supprimant la transcription de ce gène dans les tissus non lymphoïdes. D'autres répresseurs jouent des rôles clé dans la commande de la prolifération et de la différenciation cellulaires par les hormones et les facteurs de croissance (voir chapitres 13 et 14).

Rapport entre la structure de la chromatine et la transcription

Au cours des exposés précédents, nous avons toujours considéré les gènes d'eucaryotes comme des molécules d'ADN dénudées enclavées dans le noyau, mais il n'en est rien. L'ADN de la cellule eucaryote est étroitement associé aux histones pour former la chromatine. Le module de base de la chromatine est le nucléosome, une spire de 146 paires de bases d'ADN cerclant en ensemble de paires des histones H2A, H2B, H3 et H4, groupement auquel se joint une molécule d'histone H1 là où l'ADN intercalaire aborde le cœur du nucléosome (voir figure 4.9) ; de surcroît, cette structure chromatinienne se condense en s'enroulant sur elle-même pour former de grandes boucles d'ADN. Comme ce compactage de l'ADN eucaryotique influence beaucoup

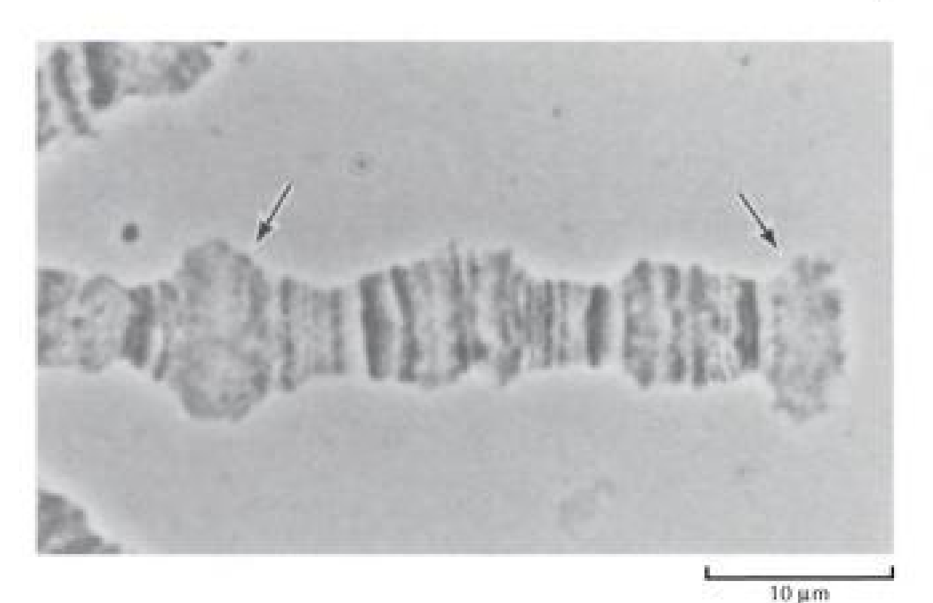


Figure 6.32
Région décondensée d'un chromosome de drosophile . Micrographie optique de régions décondensées d'un chromosome polytène (flèches), où a lieu une synthèse d'ARN. (Aimablement transmis par Joseph Gall, Carnegie Institute).

l'accessibilité de l'ADN en tant que matrice de la transcription, il nous faut tenir compte de la structure de la chromatine quand nous étudions l'expression des gènes dans la cellule d'eucaryote.

À plusieurs occasions, on discerne un rapport entre la structure de la chromatine et la transcription. D'une part, les gènes activement transcrits siègent dans des zones de chromatine décondensées, correspondant aux fibres chromatiniennes étirées de 10 nm présentées au chapitre 4 (voir figure 4.10) ; en observant les chromosomes polytènes de la drosophile au microscope, on remarque que les zones du génome sujettes à une rapide synthèse d'ARN correspondent à des zones chromosomiques décondensées (figure 6.32). D'autre part, quand on traite des noyaux intacts de cellules de vertébrés par de l'ADNase, on remarque qu'environ 10 % de l'ADN, soit la proportion de gènes activement transcrits dans toute cellule, est particulièrement sensible à la nucléase ; les gènes de globine, par exemple, subissent une dégradation par l'ADNase dans les réticulocytes (précurseurs de globules rouges), mais pas dans les autres types de cellules différenciées. Il s'avère donc que les gènes soumis à la transcription appartiennent à une partie décondensée de la chromatine, plus accessible aux facteurs de transcription que n'est le reste du génome. Les histones de cette chromatine décondensée sont modifiées, notamment par acétylation, et deux protéines chromosomiques non-histones (appelées **HMG-14** et **HMG-17**) sont associées au nucléosome (HMG est l'abréviation de *high-mobility group proteins*, protéines qui migrent rapidement lors d'une électrophorèse en gel). On commence seulement à entrevoir la portée de ces remaniements.

Comme les gènes subissant une transcription restent, même dans la chromatine décondensée, couverts de leurs histones et enroulés en nucléosomes, les facteurs de transcription et l'ARN polymérase se trouvent confrontés non à de l'ADN dénudé, mais à de la chromatine ; l'enroulement compact du brin d'ADN autour du cœur du nucléosome freine la transcription, car ils empêche les facteurs de transcription d'accéder à l'ADN, et l'ARN polymérase de transcrire au travers d'une matrice de chromatine.

Plusieurs expériences ont montré que les nucléosomes assemblés au niveau du promoteur empêchent l'amorçage de la transcription puisqu'ils s'opposent à l'attachement des facteurs de transcription et de l'ARN polymérase. Cette inhibition est levée grâce à des **facteurs de remodelage du nucléosome**, qui, en démembrant la structure chromatinienne, laissent les facteurs de transcription atteindre l'ADN nucléosomique et noyauter un complexe transcriptionnel au niveau du promoteur (figure 6.33). Il s'ensuit

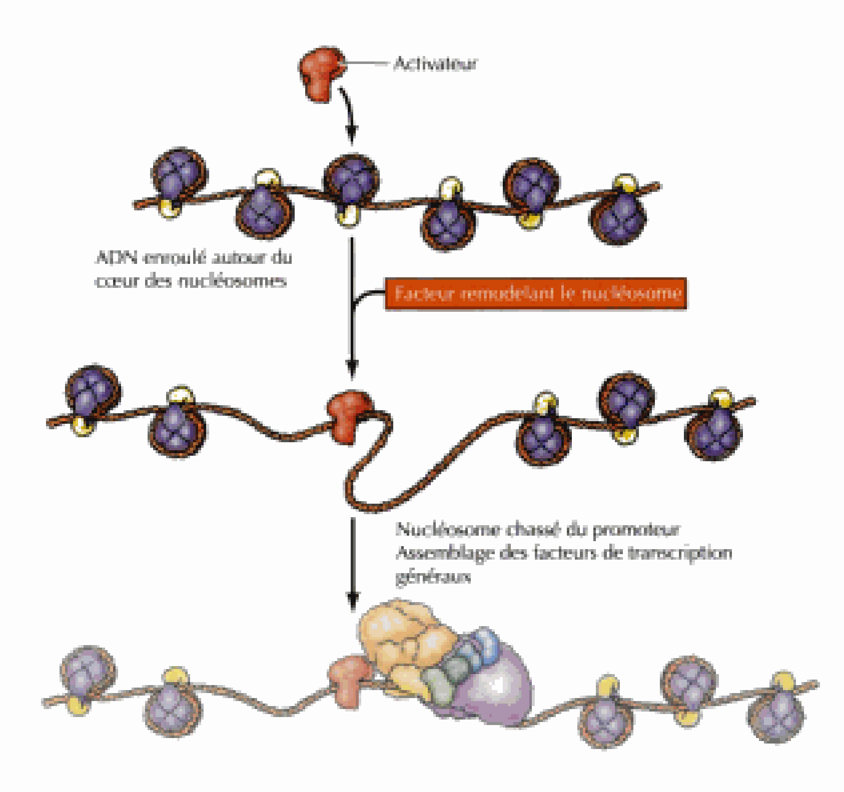
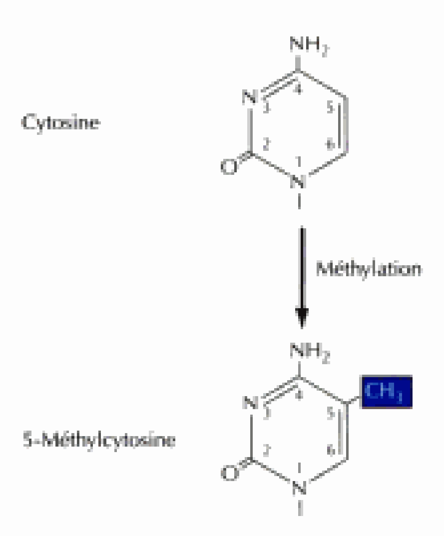


Figure 6.33
Transcription de chromatine. L'ADN de la chromatine est étroitement enroulé autour du cœur des nucléosomes, ce qui empêche les facteurs de transcription et l'ADN polymérase de se fixer. Les facteurs de remodelage du nucléosome facilitent l'attachement des facteurs de transcription et, par suite, détruisent la structure nucléosomique au niveau des régions promotrice et amplificatrice. L'ARN polymérase peut alors transcrire une matrice passant par un nucléosome.

que les régions du promoteur et de l'amplificateur des gènes en cours de transcription comportent moins de nucléosomes ou des nucléosomes moins compacts, ce qui les rend encore plus sensibles à la nucléase que ne l'est le cœur du gène ; c'est pourquoi les régions chargées de la régulation des gènes activement transcrits coïncident généralement avec les régions de chromatine caractérisées par une sensibilité extrême à l'ADNase, régions appelées **sites hypersensibles à l'ADNase.** Ceci montre le deuxième rôle joué par les activateurs de transcription eucaryotiques dans la régulation de l'expression d'un gène : outre qu'ils accélèrent la transcription par leur contacts avec les facteurs de transcription généraux, ils remodèlent la chromatine en une structure qui abolit le blocage pas les histones. On ignore le mécanisme qui dirige les facteurs de remodelage de nucléosomes vers les gènes activement transcrits ; vu la portée de ces facteurs dans la régulation de l'expression des gènes d'eucaryotes, les biologistes s'y intéressent particulièrement.

Contrairement aux séquences promotrices et amplificatrices, le corps d'un gène activement transcrit reste compacté en nucléosomes et, aussi inattendu que cela puisse paraître, l'ARN polymérase peut le franchir en démembrant les contacts entre histones et ADN. Le pouvoir qu'a l'ARN polymérase de transcrire des matrices de chromatine est dû à l'acétylation des histones et à l'association des protéines chromosomiques non histones HMG-14 et HMG-17 aux nucléosomes des gènes activement transcrits ; comme les sites de fixation de ces protéines aux nucléosomes débordent sur le site de fixation de l'histone H1, il semble que ces protéines stimulent la transcription en séparant l'histone H1 du nucléosome ; alors que l'histone H1 provoque la condensation de la chromatine, HMG-14 et HMG-17 maintiennent une structure chromatininenne ouverte qui permet de transcrire à travers une matrice de structure nucléosomique. Comme c'est le cas pour les facteurs de remodelage du nucléosome, on ignore quel signal entraîne HMG-14 et HMG-17 vers les gènes activement transcrits.

Figure 6.34
Méthylation d'un ADN. Un groupe méthyle est transféré au carbone 5 d'un résidu cytosine de l'ADN.



Méthylation de l'ADN

Un autre mécanisme qui semble intervenir pour moduler l'expression des gènes de vertébré est la méthylation de l'ADN. Les résidus cytosine de

l'ADN de vertébré sont modifiés par transfert d'un groupe méthyle au carbone 5 (figure 6.34) ; cela se produit particulièrement sur les résidus C précédant un G dans la chaîne d'ADN (dinucléotides CpG). Il semble que cette méthylation soit en rapport avec une transcription ralentie d'au moins certains gènes. Le profil de méthylation de l'ADN varie selon le tissu envisagé, l'ADN des gènes inactifs étant plus méthylé que l'ADN de gènes soumis à une transcription active. En outre, dans certains gènes on trouve beaucoup de dinucléotides CpG au voisinage du promoteur ; la méthylation réprime la transcription de ces gènes par le truchement d'une protéine qui inhibe la transcription en se fixant sélectivement à l'ADN méthylé.

Si la méthylation d'un ADN provoque une inhibition de sa transcription, sa portée dans la régulation des gènes n'est pas claire. Souvent, on considère la méthylation de gènes inertes comme une conséquence et non comme la cause de leur inertie transcriptionnelle. On a cependant découvert un rôle régulateur important dans le phénomène baptisé **estampillage génomique**, qui gouverne l'expression de certains gène impliqués dans le développement de l'embryon de mammifère. Dans la plupart des cas, tant l'allèle paternel que l'allèle maternel d'un gène s'exprime dans les cellules diploïdes. Il existe cependant quelques gènes estampillés (on en a décrit 16 en tout chez l'Homme et la souris) dont l'expression dépend du fait qu'ils proviennent du père ou de la mère. Dans certains cas, c'est l'allèle paternel du gène estampillé qui s'exprime, l'allèle maternel restant inerte, dans d'autres cas, c'est l'inverse.

Bien que la portée biologique de l'estampillage génomique soit incertaine, la méthylation de l'ADN distingue l'allèle maternel de l'allèle paternel des gènes estampillés. C'est le cas du gène *H19*, transcrit seulement de l'allèle maternel (figure 6.35) ; ce gène est méthylé sélectivement pendant le développement des cellules germinales de l'embryon mâle, pas de celles de la femelle. Au moment de la fécondation, l'embryon reçoit un allèle paternel méthylé et un allèle maternel non méthylé du gène ; après chaque réplication d'ADN, ces traits se perpétuent grâce à un enzyme qui méthyle spécifiquement les séquences CpG d'un brin fils qui est lié par des liaisons hydrogène au brin parental méthylé (figure 6.36) ; aussi l'allèle paternel *H19* reste-t-il méthylé et, ce faisant, réfractaire à la transcription dans les cellules embryonnaires et les cellules somatiques. Néanmoins, l'allèle *H19* paternel perd ses groupes méthyle dans la lignée germinale, ce qui permet l'établissement d'un nouveau profil de méthylation en vue de la transmission à la prochaine génération.

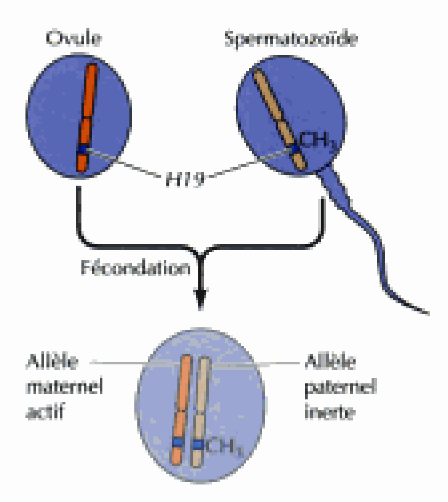


Figure 6.35
Estampillage génomique. Le gène *H19* est sélectivement méthylé lors de la différenciation des cellules de la lignée germinale mâle ; le spermatozoïde possède donc un allèle *H19* méthylé et l'ovule possède l'allèle correspondant non méthylé. Après la fécondation, l'allèle paternel méthylé ne participe pas à la transcription, seul l'allèle maternel non méthylé s'exprime chez l'embryon.

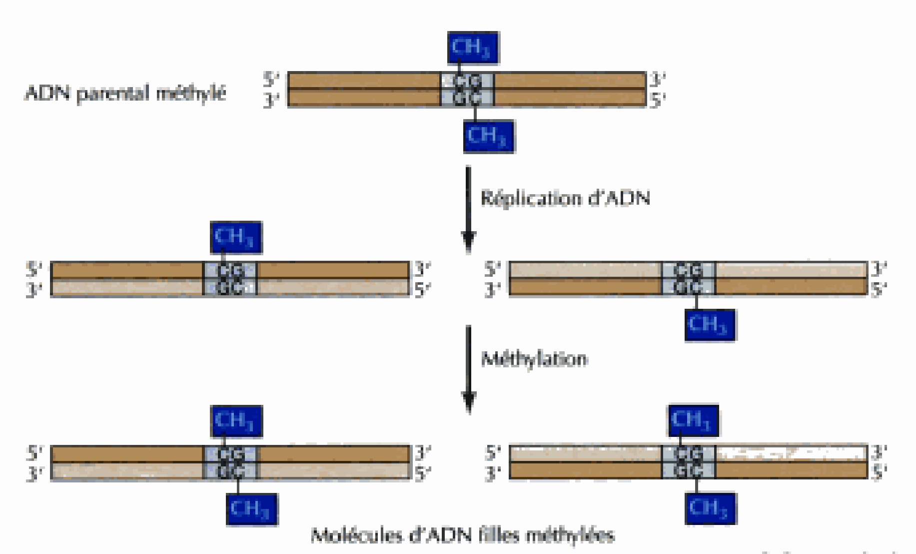


Figure 6.36
Conservation du profil de méthylation. Dans l'ADN parental, les deux brins sont méthylés au niveau de séquences CpG complémentaires. Après la réplication, seul le brin parental de chaque nouvelle molécule fille est méthylé ; les brins fils nouveaux seront méthylés par un enzyme qui reconnaît spécifiquement les séquences CpG en face d'un site de méthylation.

MATURATION ET RENOUVELLEMENT DES ARN

Si la transcription est la première étape, et la plus étroitement ajustée, de l'expression d'un gène, elle prélude à une série d'événements conduisant à la production d'un ARN prêt à fonctionner ; la plupart des ARN sortis de la machinerie de transcription seront transformés de diverses manières avant de pouvoir fonctionner. Les ARN bactériens codant une protéine font exception, car, comme on l'a dit au début de ce chapitre, pendant que leur synthèse est en marche, ces ARN servent déjà de matrice pour la synthèse protéique, mais les transcrits primaires d'ARNr et d'ARNt subiront plusieurs modifications tant chez les procaryotes que chez les eucaryotes. Les transcrits primaires d'ARN eucaryotiques subissent aussi d'importants remaniements, notamment l'excision d'introns, avant de passer du noyau au cytoplasme pour servir de matrice à la machinerie de traduction. Toute modulation de ces processus de maturation est un niveau supplémentaire de régulation de l'expression des gènes, comme l'est aussi la vitesse à laquelle chaque ARNm sera mis hors fonction dans la cellule.

Maturation des ARN ribosomiaux et des ARN de transfert

Le schéma de maturation des ARN ribosomiaux et des ARN de transfert est semblable chez les procaryotes et les eucaryotes, comme on s'y attend quand on considère le rôle fondamental joué par ces ARN dans la synthèse des protéines. Comme on l'a dit, les eucaryotes possèdent quatre espèces d'ARN ribosomiaux (voir tableau 6.1), dont trois (les ARNr 28S, 18S et 5,8S) proviennent du partage d'un long transcrit précurseur appelé **pré-ARNr** (figure 6.37). Les procaryotes possèdent trois ARN ribosomiaux (23S, 16S et 5S), qui correspondent aux 28S, 18S et 5S des cellules d'eucaryote et se forment par partage d'un seul transcrit pré-ARNr. Le seul ARNr peu remanié est l'ARNr 5S d'eucaryote, transcrit sur un gène séparé.

La maturation des pré-ARNr de procaryote et d'eucaryote a lieu en plusieurs étapes. Le premier partage du pré-ARNr bactérien donne un précurseur pour chacun des trois ARN ; d'autres élagages en feront la forme défi-

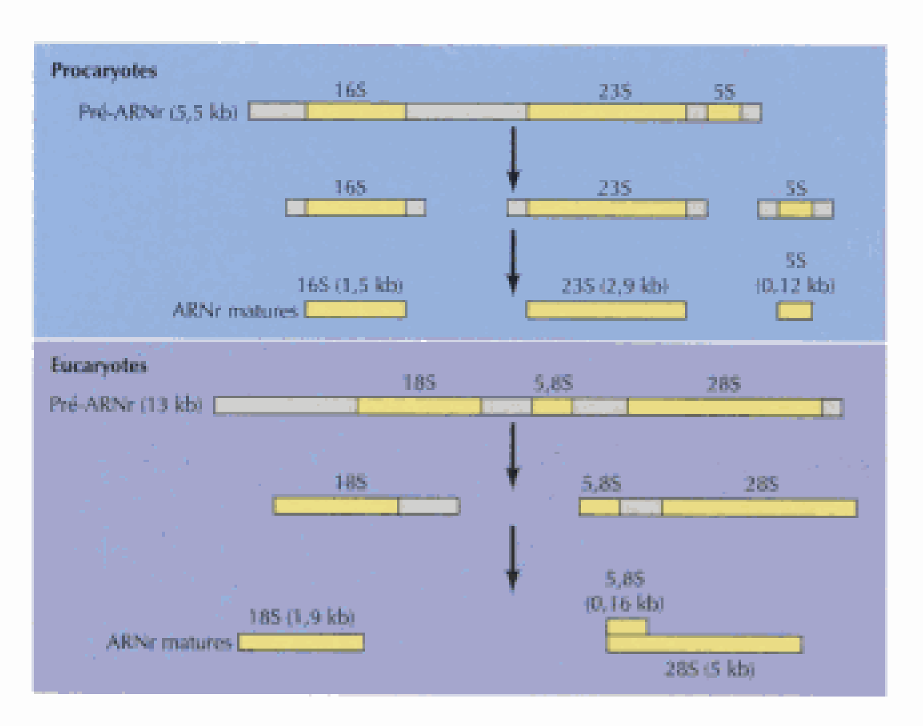


Figure 6.37
Maturation des ARN ribosomiaux. Les cellules de procaryote possèdent trois ARNr (16S, 23S et 5S) formés par découpage d'un transcrit de pré-ARNr. Les cellules d'eucaryote (par exemple humaines) possèdent quatre ARNr ; l'un d'eux (l'ARNr 5S) est transcrit d'un gène différent, les trois autres (18S, 28S et 5,8S) proviennent d'un ARNr précurseur commun ; après partage, l'ARNr 5,8S (propre aux eucaryotes) s'attache à l'ARNr 28S par des liaisons hydrogène.

nitive. Dans les cellules d'eucaryote, le pré-ARNr est d'abord scindé au voisinage de l'ARNr 5,8S, du côté 5', en donnant deux précurseurs qui contiennent respectivement les ARNr 18S et 28S + 5,8S. Des scissions supplémentaires donneront les produits finals, l'ARNr 5,8S restant attaché à la molécule 28S par des liaisons hydrogène. Outre ces scissions, les ARNr subissent l'addition de groupes méthyle sur des bases et des sucres de nucléotides particuliers, modification dont on ignore d'ailleurs le rôle.

Comme les ARNr, les ARNt de bactérie et d'eucaryote sont synthétisés sous forme de longs précurseurs, les **pré-ARNt**, dont certains comportent des séquences d'ARNt uniques (figure 6.38). Chez les bactéries, certains ARNt font partie des transcrits de pré-ARNr. La maturation du bout 5' des pré-ARNt met en jeu une scission par un enzyme appelé **ARNase P**, réaction très intéressante car c'est le prototype d'une réaction catalysée par un ARN à pouvoir catalytique ; l'enzyme se compose d'une molécule d'ARN et d'une molécule de protéine, toutes deux indispensables pour que l'enzyme soit bien actif. En 1983, Sidney Altman et ses collaborateurs montrèrent que le composant ARN à lui seul a le pouvoir de catalyser la scission du pré-ARNt ; ces expériences établirent que l'ARNase P est un **ribozyme**, un enzyme dans lequel c'est l'ARN et non la protéine qui effectue la catalyse.

Le bout 3' des ARNt se forme par action d'une ARNase ordinaire, mais la maturation de cette extrémité de la molécule d'ARNt requiert aussi une intervention inhabituelle, à savoir l'addition d'un CCA terminal. Les ARNt portent tous la séquence CCA à leur bout 3' ; cette séquence est le site où est transféré le résidu d'acide aminé et sert pendant la synthèse des protéines. Le bout CCA est codé par l'ADN de certains gènes d'ARNt, mais il

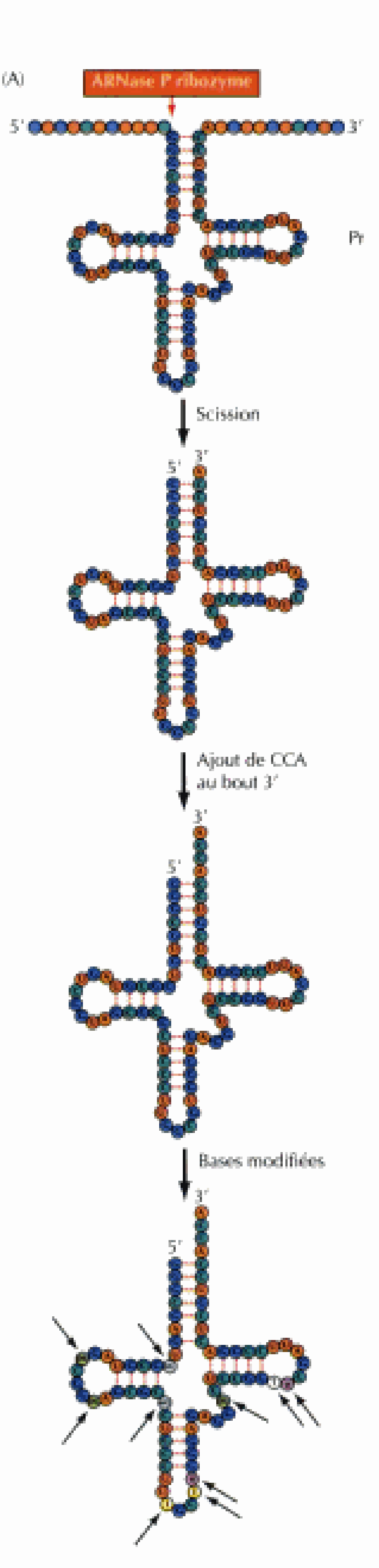
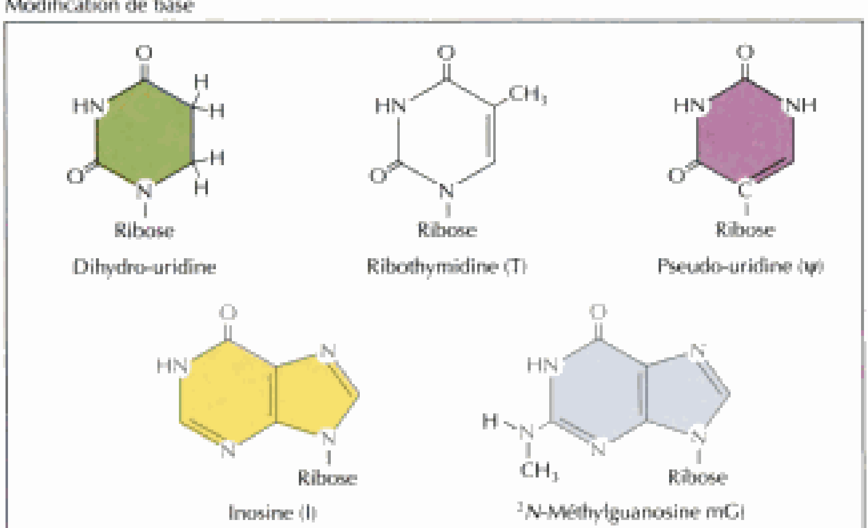


Figure 6.38
Maturation des ARN de transfert. (A) Les ARN de transfert sont issus de pré-ARNt dont certains contiennent plusieurs molécules d'ARNt bien déterminées. Une scission au bout 5' de l'ARNt est catalysée par le ribozyme appelé ARNase P ; la scission au bout 3' est catalysée par une ARNase protéique ordinaire. Une séquence CCA est ensuite greffée au bout 3' de beaucoup d'ARNt dès la fin de la synthèse de leur chaîne. Enfin, certaines bases sont remaniées en des points caractéristiques des molécules d'ARNt ; les nucléotides remaniés dessinés ici sont la dihydro-uridine (DHU), la méthylguanosine (mG), l'inosine (I), la ribothymidine (T) et la pseudo-uridine (y). (B) Structure des bases remaniées ; les ribothymidine, dihydro-uridine et pseudo-uridine proviennent de modifications des uridines de l'ARNt ; les méthyguanosine et inosine sont des guanosines modifiées.

(B)
Modification de base



ne l'est pas dans d'autres ; aussi est-il greffé pendant la maturation de l'ARN par un enzyme qui reconnaît l'extrémité 3' de tous les ARNt dépourvus de cette séquence et qui leur transfère cette séquence.

Un autre trait singulier de la maturation des ARNt est la profonde transformation subie par les bases des molécules d'ARNt ; environ 10 % des bases y sont transformées en toutes sortes de dérivés, en des positions bien particulières de la molécule d'ARNt (voir figure 6.38). Le rôle de la plupart des modifications de ces bases nous est inconnu, mais certaines jouent un rôle important dans la synthèse protéique, en modifiant leurs propriétés d'appariement entre bases dans la molécule d'ARNt (voir chapitre 7).

Chez quelques organismes, certains pré-ARNt ainsi que certains pré-ARNr comportent des introns qui sont éliminés par excision-épissage ; nous y reviendrons dans la section qui suit, en décrivant d'autres réactions d'excision.

Maturation des ARNm d'eucaryotes

Contrairement à la maturation des ARN de transfert et ribosomiaux, celle des ARNm marque une grande différence entre procaryotes et eucaryotes. Chez les bactéries, les ribosomes accèdent directement aux ARNm et commencent à les traduire avant même qu'ils ne soient complétés. Chez les eucaryotes, l'ARNm, synthétisé dans le noyau, doit passer au cytoplasme avant de servir de matrice à la traduction ; en outre, chez les eucaryotes, les produits initiaux de la transcription (**pré-ARNm**) sont profondément modifiés avant d'être exportés du noyau, à savoir, modifiés aux deux bouts de la molécule et débarrassés des introns qui occupaient leur milieu (figure 6.39).

Peu après sa synthèse, le bout 5' d'un pré-ARNm est modifié par addition d'une structure appelée **coiffe de 7-méthyl guanosine** ; l'événement commence par un transfert de GTP placé en sens opposé par rapport au nucléotide 5'-terminal du pré-ARNm. Des groupes méthyle sont ensuite transférés à ce résidu G et au groupe ribosyle d'un ou de deux nucléotides siégeant en 5' de la chaîne d'ARN. Cette coiffé 5' aligne l'ARNm eucaryotique sur le ribosome lors de la traduction (voir chapitre 7).

Le bout 3' de la plupart des ARNm d'eucaryotes est fixé non par la fin de la transcription, mais par coupure du transcrit primaire et assemblage d'une **queue poly-A**, une réaction de maturation appelée **polyadénylation** (figure 6.40). Dans les cellules animales, le signal de polyadénylation est la séquence AAUAAA ; elle est reconnue par un ensemble de protéines, comprenant une endonucléase qui coupe la chaîne d'ARN à une distance de 10 à 30 nucléotides plus en aval. Une poly-A polymérase distincte construit ensuite une chaine poly-A d'environ 200 nucléotides au bout du transcrit ; ce processus achève la transcription par l'ARN polymérase, qui finit en général à quelques centaines de nucléotides en aval du site de poly-adénylation.

On a montré que les queues poly-A influencent la stabilité et le degré de traduction des ARNm, mais on n'en connaît pas bien le mécanisme. En outre, comme certains ARNm d'eucaryotes (par exemple, ceux des histones) ne sont pas poly-adénylés, la queue poly-A n'est pas absolument indispensable au fonctionnement d'un ARNm. D'autre part, la poly-adénylation joue un rôle régulateur important au début du développement embryonnaire, quand le changement de longueur des queues poly-A ajuste la traduction de l'ARNm ; ainsi, nombre d'ARNm mis en réserve dans l'ovule échappent à la traduction à cause de leur courte queue poly-A (environ 20 nucléotides) ; la fécondation provoque l'allongement des queues poly-A de ces ARNm de réserve, ce qui enclenche leur traduction et la synthèse des protéines au début du développement embryonnaire.

La refonte la plus frappante que subit un pré-ARNm est l'élimination de ses introns par excision-épissage ; comme on l'a vu au chapitre 4, la séquence codante de la plupart des gènes d'eucaryotes est interrompue par des

Figure 6.39
Maturation des ARN messagers d'eucaryotes. Le remaniement d'un ARNm met en jeu une modification de son bout 5' par l'addition d'une coiffe de 7-méthylguanosine (m^7G), une modification de son bout 3' par une poly-adénylation, et une élimination des introns par excision-épissage. La coiffe 5' se forme par transfert de GTP en sens inverse de celui de l'ARNm, pour former une liaison 5'→5'. Le G introduit est ensuite méthylé en position 7 et des groupes méthyle sont transférés au ribose de l'un ou des deux premiers nucléotides de l'ARNm.

séquences non codantes (introns) qui seront excisées avec précision pour former l'ARNm mature. Beaucoup de gènes comportent plusieurs introns, dont la longueur des séquences dans les pré-ARNm représente en moyenne près de dix fois celle des exons. La surprenante découverte des introns en 1977 poussa les chercheurs à trouver les mécanismes d'excision et d'épissage, qu'on s'attendit à voir fonctionner avec une grande précision puisque le fonctionnement des ARNm en dépend. Les études ultérieures du mécanisme d'excision-épissage ont non seulement révélé de nouveaux mécanismes

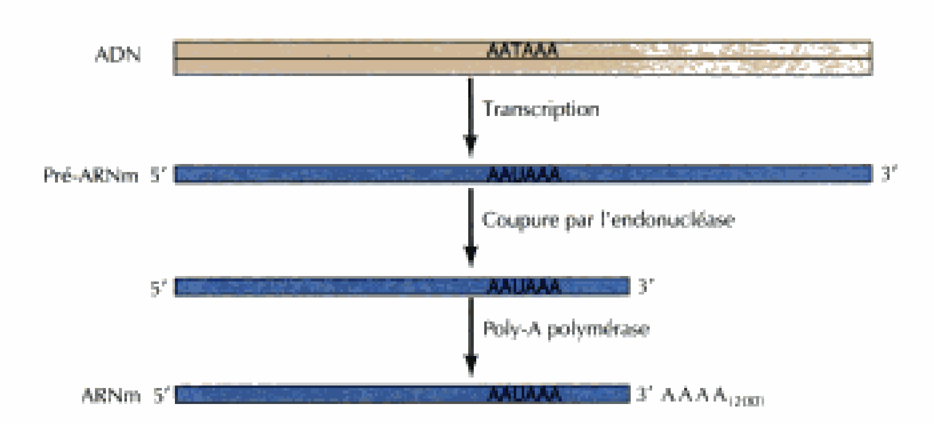


Figure 6.40
Formation du bout 3' des ARNm d'eucaryotes. Une endonucléase coupe le pré-ARNm à une distance de 10 à 30 nucléotides en aval du site de poly-adénylation (AAUAAA dans les cellules animales). Une poly-A polymérase ajoute ensuite une queue poly-A consistant en environ 200 résidus A au bout 3' de l'ARNm.

de régulation de l'expression génique, mais aussi permis d'attribuer aux molécules d'ARN de nouvelles activités catalytiques.

Mécanismes de l'excision-épissage

C'est grâce à la mise au point de systèmes *in vitro* effectuant bien la réaction d'excision-épissage qu'on en a élucidé le mécanisme (figure 6.41). À partir de gènes de structure (pourvus d'introns) clonés et munis d'un promoteur reconnu par l'ARN polymérase de bactériophage, on fit la synthèse de pré-ARNm qu'on pouvait ensuite purifier en grande quantité ; en ajoutant ces pré-ARNm à des extraits de noyaux de cellules de mammifères, on remarqua que ces pré-ARNm subissaient un processus d'excision-épissage correct. Comme c'était le cas pour la transcription, l'avantage d'un système *in vitro* permit de sonder le processus d'excision-épissage bien plus à fond qu'on ne l'aurait fait dans des cellules intactes.

En étudiant les intermédiaires et les produits de la réaction formés *in vitro*, on découvrit que l'excision-épissage du pré-ARNm se passe en deux phases (figure 6.42) ; le pré-ARNm est d'abord coupé au site d'épissage 5' et le bout 5' de l'intron est soudé à un résidu adénine intérieur voisin du bout 3' de l'intron. Dans cette étape, se forme une liaison inusitée entre le bout 5' de l'intron et le groupe hydroxyle 2' de l'adénine, l'intermédiaire formé étant

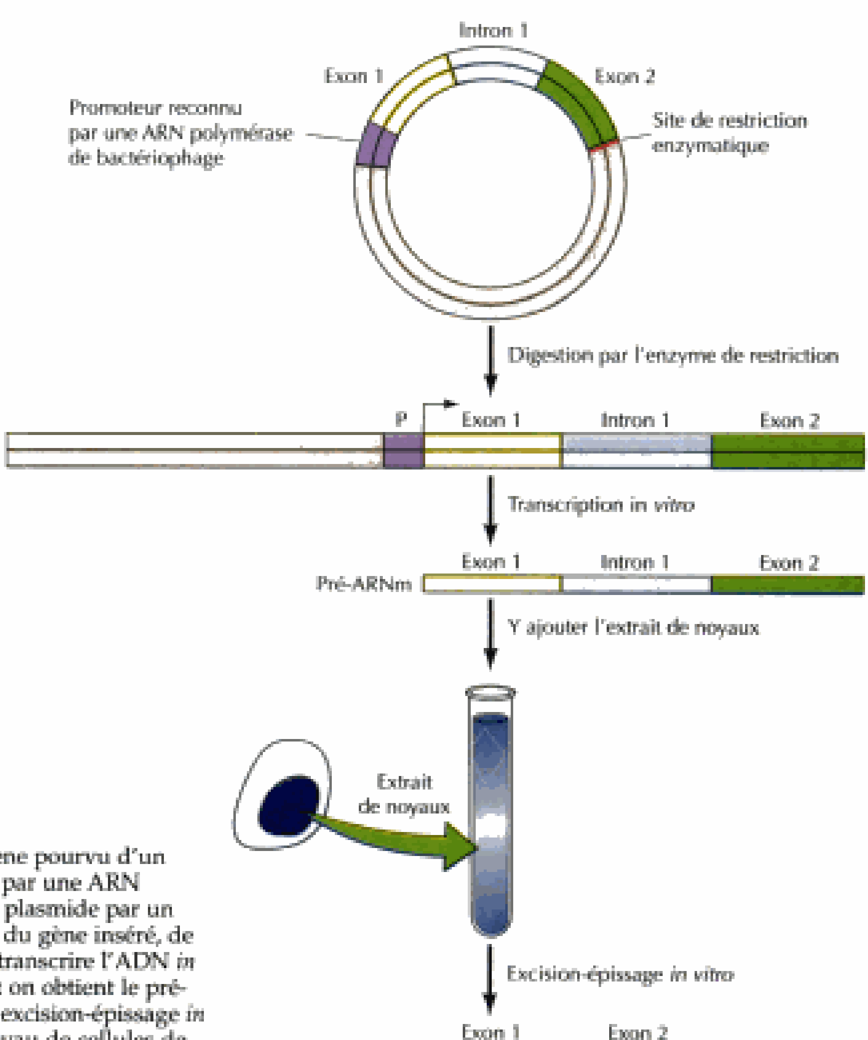


Figure 6.41
Excision-épissage *in vitro*. On clone un gène pourvu d'un intron en aval d'un promoteur (P) reconnu par une ARN polymérase de bactériophage. On digère le plasmide par un enzyme de restriction qui coupe au bout 3' du gène inséré, de façon à ouvrir la molécule. On fait ensuite transcrire l'ADN *in vitro* par la polymérase du bactériophage et on obtient le pré-ARNm désiré. Pour étudier les réactions d'excision-épissage *in vitro*, il suffit de lui ajouter un extrait de noyau de cellules de mammifère.

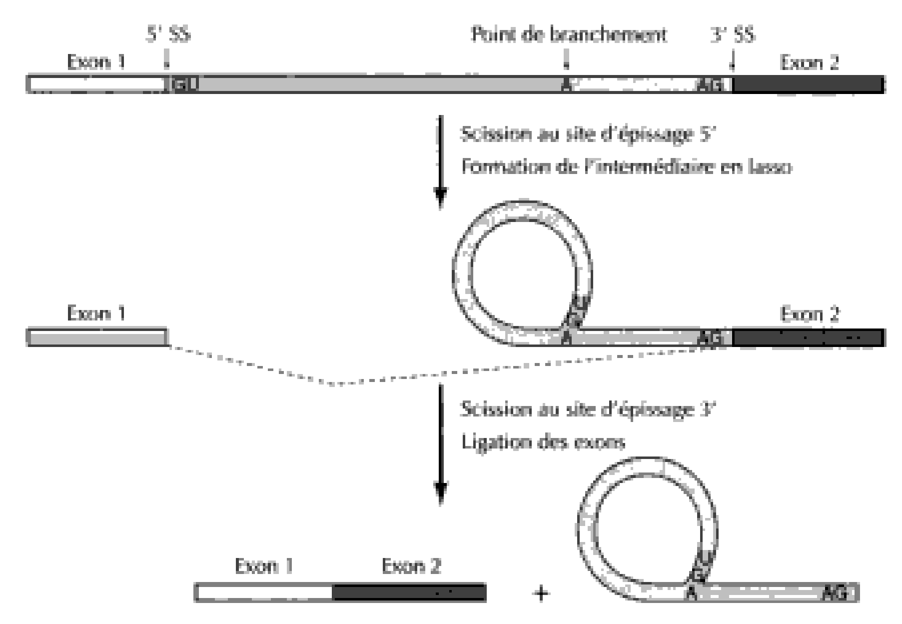


Figure 6.42
Excision-épissage d'un pré-ARNm. Il se passe deux réactions successives. La première est la scission de la molécule au site d'excision-épissage 5'(SS) et l'union de ce bout 5' de l'intron à un résidu A au sein de l'intron (point de branchement), pour donner un intermédiaire en lasso, dont la boucle est constituée de l'intron. La seconde réaction est la coupure au site 3' et la réunion simultanée des exons, avec départ de l'intron sous forme de lasso.

une structure en lasso, dont l'intron constitue la boucle. La deuxième phase consiste en la coupure du site d'épissage 3' avec épissage simultané des deux exons. L'intron est donc excisé sous forme de lasso, que le noyau cellulaire ouvre et découpe en nucléotides.

Ces réactions définissent trois éléments de séquences critiques des pré-ARNm : celui du site 5', celui du site 3' et celui de l'intérieur de l'intron, là où le bout 5'de l'intron se greffe pour former le lasso (voir figure 6.42). Tout pré-ARNm est pourvu de ces séquences consensus en chacune de ces positions, ce qui permet à l'appareil d'excision-épissage de reconnaître les pré-ARNm et d'effectuer les réactions de clivage et de soudure en jeu dans le processus d'excision-épissage.

L'examen biochimique des extraits de noyaux a montré que l'excision-épissage s'effectue dans de grands complexes appelés **particules d'excision-épissage**, composées de protéines et d'ARN ; ceux-ci comprennent cinq types de **petits ARN nucléaires** (ARNpn) étiquetés U1, U2, U4, U5 et U6 ; ces ARNpn, longs d'environ 50 à 200 nucléotides, se complètent de 6 à 10 molécules de protéines en formant de petites particules ribonucléoprotéiques nucléaires (**RNPpn**), acteurs clé du processus d'excision-épissage. Les particules RNPpn U1, U2 et U5 comportent chacune une molécule d'ARN unique, tandis que les ARNpn U4 et U6 sont attachés l'un à l'autre pour former une seule particule RNPpn.

L'assemblage de la particule d'excision-épissage débute par la liaison de la RNPpn U1 au site d'épissage 5' du pré-ARNm (figure 6.43) ; cette reconnaissance est due à l'appariement des bases de la séquence consensus de ce site 5' avec une séquence complémentaire située au bout 5' de l'ARNpn U1

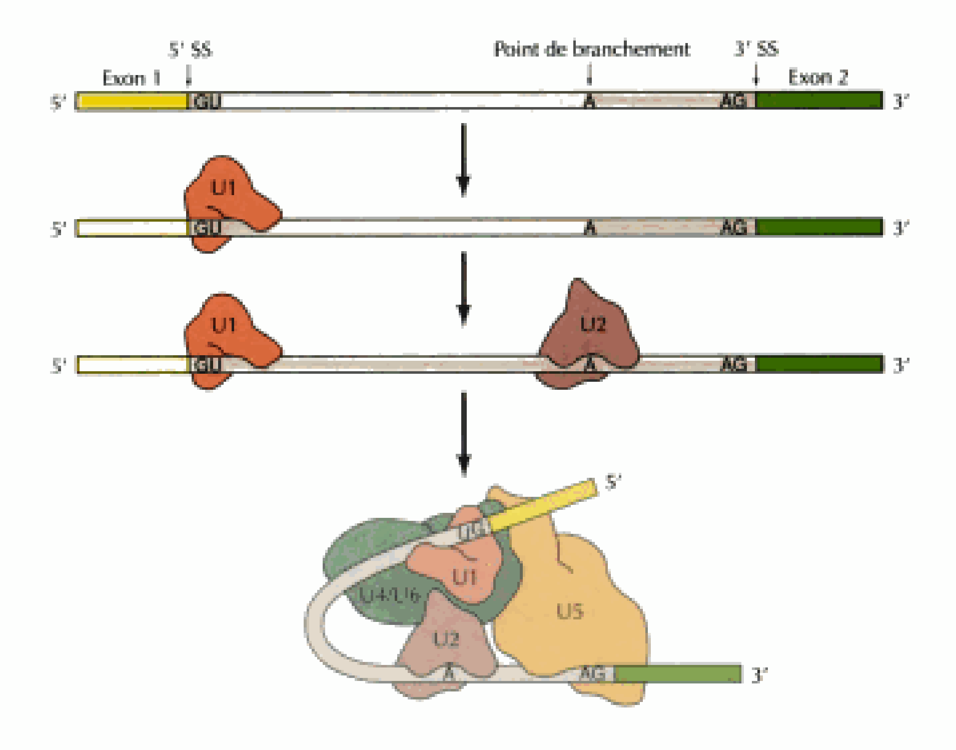


Figure 6.43
Assemblage de la particule d'excision-épissage. C'est d'abord la RNPpn U1 qui se fixe au site d'épissage 5' (SS), puis la RNPpn U2 qui va au point de branchement. Un complexe préformé constitué des RNPpn U4/U6 et U5 rejoint ensuite la particule, U5 tirant le site 5' au voisinage du site 3'.

(figure 6.44).U2 va ensuite se joindre au point de branchement, grâce à une complémentarité semblable entre l'ARNpn U2 et la séquence du point de branchement. Un complexe préformé comprenant les RNPpn U4/U6 et U5 vient alors se joindre à la particule, U5 s'attachant à des séquences des sites d'épissage 5' et 3' (voir figure 6.43).

Les ARNpn ne font pas que reconnaître les séquences consensus du point de branchement et des site d'épissage des pré-ARNm, ils catalysent directement la réaction d'excision-épissage. Ce rôle catalytique joué par un ARN dans l'épissage fut découvert au moment où on observa que certains ARN sont capables d'effectuer leur propre excision-épissage, c'est-à-dire d'exciser eux-mêmes leur introns en absence d'autres facteurs protéiques ou ARN. L'auto-épissage fut décrit pour la première fois par Tom Cech et ses collègues qui étudiaient l'ARNr 28S du protozoaire *Tetrahymena* ; cet ARN comporte un intron d'environ 400 bases, excisé avec grande précision quand on incube le pré-ARNr en l'absence de toute protéine. Des travaux ultérieurs révélèrent que l'excision-épissage est catalysée par l'intron, qui agit comme un ribozyme pour s'auto-extraire de la molécule de pré-ARNr. La découverte de l'auto-épissage de l'ARNr de *Tetrahymena*, ainsi que l'étude de l'ARNase P déjà mentionnée, fournirent la première preuve que l'ARN exerce une activité catalytique.

D'autres travaux ont retrouvé l'auto-épissage des ARN dans les mitochondries, les chloroplastes et les bactéries. On classe ces ARN auto-épisseurs en deux catégories selon le mécanisme de leur réaction (figure 6.45). L'épissage des introns de groupe I (par exemple, le pré-ARNr de *Tetrahymena*) commence par la coupure au site 5' avec l'aide du cofacteur guanosine, puis le bout 3'de l'exon libre réagit avec le site d'épissage 3' pour exciser l'intron sous forme de molécule d'ARN ouverte. Par contre, les réactions d'auto-épissage des introns de groupe II (par exemple, certains pré-ARNm mitochondriaux) ressemblent de près à celles qui caractérisent l'excision-épissage des pré-ARNm nucléaires, chez lesquels la coupure du site d'épissage 5' résulte de l'attaque par un résidu adénosine intérieur à l'intron ; comme dans ce dernier cas, il se forme une structure en lasso, qui quitte le site.

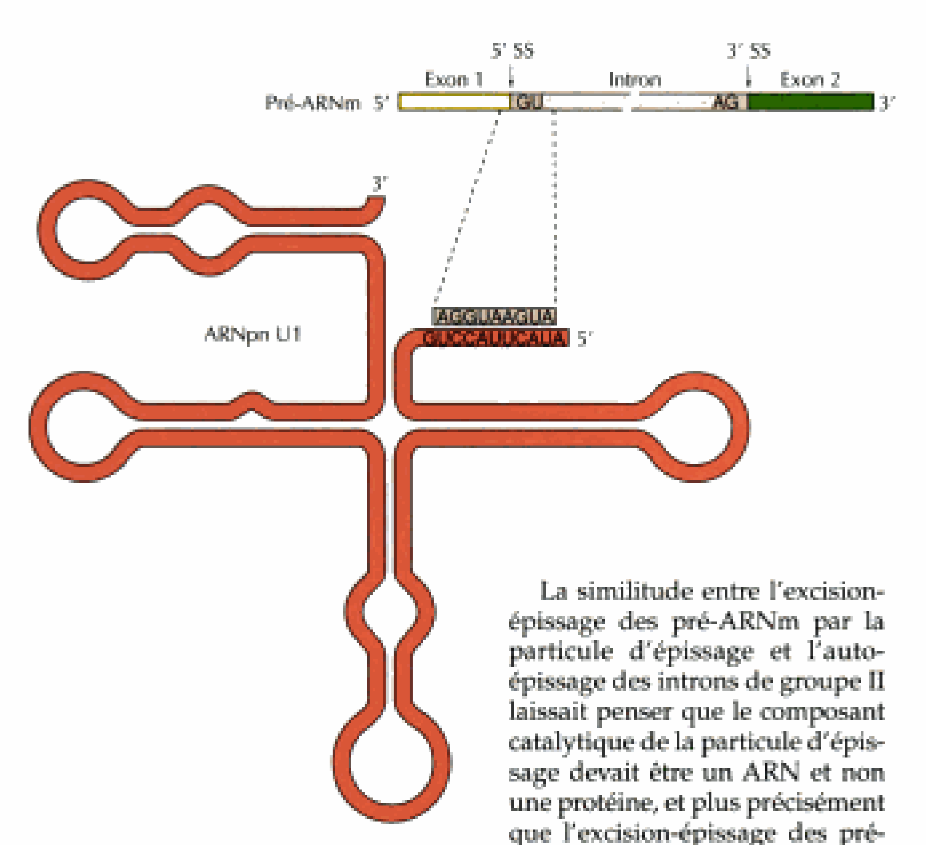
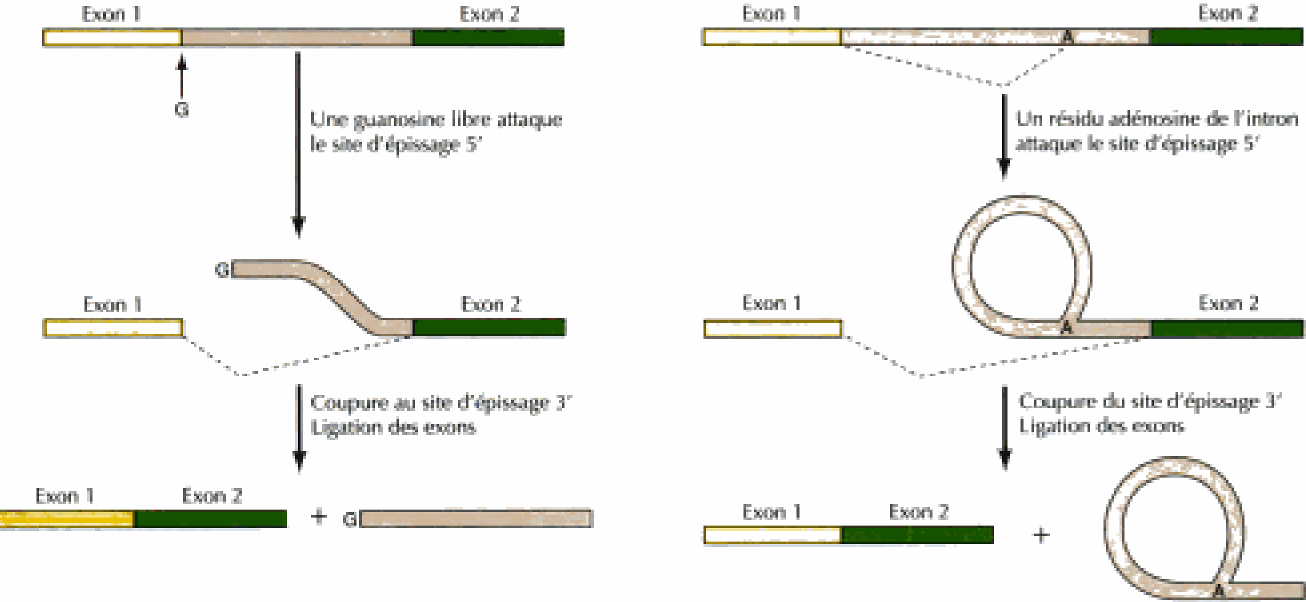


Figure 6.44
Fixation de l'ARNpn U1 au site d'excision-épissage 5′. Le bout 5′ de l'ARNpn U1 se fixe à la séquence consensus du site d'épissage 5′ par complémentarité de bases.

La similitude entre l'excision-épissage des pré-ARNm par la particule d'épissage et l'auto-épissage des introns de groupe II laissait penser que le composant catalytique de la particule d'épissage devait être un ARN et non une protéine, et plus précisément que l'excision-épissage des pré-ARNm était catalysée par les ARNpn de la particule. Les travaux ultérieurs ont confirmé ce point de vue : on a en effet identifié les ARNpn U2, U5 et U6 comme les composants catalytiques de la particule d'excision-épissage. On considère la réaction de refonte des pré-ARNm comme une réaction catalysée par l'ARN, ici les ARNpn de la particule, effectuant une réaction analogue à celle des introns auto-épisseurs du groupe II. Certaines protéines de la particule entrent cependant en jeu, mais on ne connaît pas bien la part prise par chaque com-

Figure 6.45
Auto-épissage d'introns. Les introns de groupe I capables d'auto-épissage diffèrent de ceux de groupe II par le mécanisme de leur réaction. Dans ceux du groupe I (à gauche), la coupure au site d'épissage 5′ s'accompagne de la réaction avec un cofacteur guanosine, pour donner un intermédiaire ouvert garni d'un résidu guanosine au bout 5′ de l'intron. Chez les introns de groupe II (à droite) (comme dans l'excision-épissage des pré-ARNm), le site d'épissage 5′ réagit d'abord avec un résidu A de l'intérieur de l'intron, pour former un intermédiaire en forme de lasso. Dans les deux groupes, la seconde étape est la coupure du site 3′ avec réunion simultanée des exons.



posant dans la réaction. Un rôle important des protéines de la particule est d'identifier et de choisir le site d'épissage reconnu par les ARNpn ; aussi, certains facteurs protéiques auxiliaires sont-ils indispensables à la fixation des RNPpn U1 et U2 aux sites appropriés du pré-ARNm. Comme beaucoup de pré-ARNm comportent plus d'un intron, la machinerie d'excision-épissage doit pouvoir retrouver les sites d'épissage 5' et 3' de façon à produire un ARNm fonctionnel ; si on n'en connaît pas encore le mécanisme, on sait du moins que les facteurs protéiques d'épissage y jouent un rôle primordial.

Notons pour finir que le mécanisme d'excision-épissage des pré-ARNt diffère des deux types de réactions d'auto-épissage et de l'excision-épissage effectuée sur les pré-ARNm nucléaires. Celui qui remanie les pré-ARNt met en jeu des enzymes protéiques conventionnels, sans l'intervention d'aucun ARN ; une endonucléase clive dans les sites d'excision-épissage, avec départ d'un intron ouvert ; puis vient une soudure des exons, qui fournit l'ARNt mature. Bien que les introns des ARNt puissent participer à la réaction d'excision-épissage, cette réaction est sans conteste bien différente des autres réactions d'excision-épissage par ARN interposé.

Variations sur le thème de l'excision-épissage des pré-ARNm

Le rôle central joué par l'excision-épissage dans la refonte d'un pré-ARNm fait penser que l'expression d'un gène pourrait être ajustée par modulation de l'activité de la machinerie d'excision-épissage ; en outre, comme la plupart des pré-ARNm comportent plus d'un intron, un gène donné peut donner lieu à la formation de plusieurs ARNm si des sites 5' et des sites 3' se combinent de façons différentes. En unissant des exons par des combinaisons variées, la cellule jouit d'un autre moyen de moduler l'expression d'un gène, car, à partir d'un seul pré-ARNm, la cellule peut produire plusieurs ARNm (donc plusieurs protéines). Ce processus, l'**épissage à choix multiples** n'est pas rare dans les gènes des eucaryotes supérieurs et offre un moyen radical de moduler l'expression d'un gène selon le tissu ou la période du développement embryonnaire.

On trouve un cas intéressant d'épissage à variantes dans certains gènes codant des protéines en jeu dans la régulation de la transcription ; dans plusieurs cas, l'épissage à choix multiples de ces pré-ARNm forme des protéines qui fonctionnent de façon radicalement différente, par exemple comme activateur, ou comme répresseur de transcription (figure 6.46). Rappelons qu'un activateur transcriptionnel comporte deux domaines : l'un se fixe à une séquence d'ADN, l'autre est son domaine d'activation. Comme ces domaines sont généralement codés par des exons distincts, toute excision-épissage à variantes va réassortir ces exons sous formes de combinaisons diverses, produisant soit un activateur soit un répresseur à partir du même gène. Tout épissage donnant un ARNm pourvu d'exons codant à la fois un domaine de fixation à l'ADN et un domaine d'activation aboutit à la synthèse d'une pro-

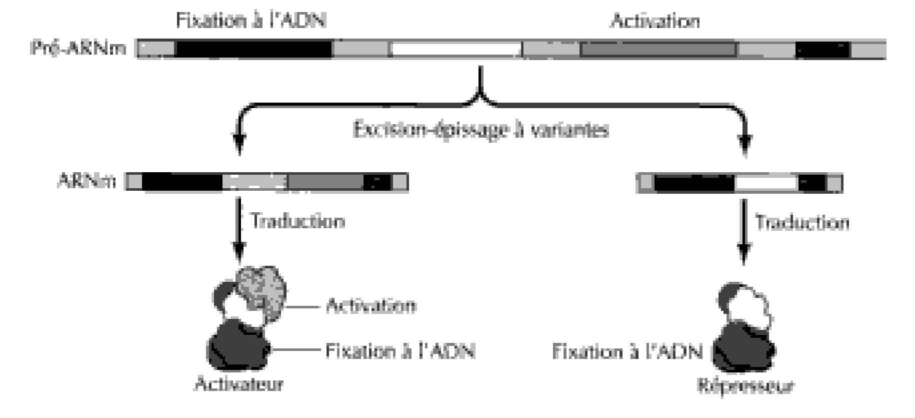


Figure 6.46
Excision-épissage à choix multiples d'un pré-ARNm codant un facteur de transcription. Cette protéine régulatrice de la transcription est codée par quatre exons : le premier code le domaine se fixant à l'ADN, le troisième code le domaine d'activation. Le pré-ARNm peut subir deux espèces d'excision-épissage : la première résulte en l'union des quatre exons, pour donner un ARNm qui code un activateur de transcription. Dans l'autre espèce d'excision, l'exon 2 est directement soudé à l'exon 4, pour donner un ARNm dépourvu du troisième exon ; la traduction de cet ARN messager produira une protéine dépourvue de domaine d'activation, qui, de ce fait, se comporte comme un répresseur et non comme un activateur de transcription.

téine activatrice. Un épissage à choix multiples peut cependant donner un ARNm codant un domaine de fixation à l'ADN, mais dépourvu de domaine activateur ; quand cet ARNm est traduit, ce sera sous forme d'un répresseur, qui ralentira la transcription du gène en entrant en compétition avec l'activateur envers leur séquence cible dans l'ADN (voir figure 6.31).

Comme le profil de l'excision-épissage à choix multiples varie selon le tissu, la régulation de l'excision-épissage fournit un moyen puissant d'adapter l'expression des gènes à tel ou tel tissu. Bien qu'on ignore le mécanisme de sélection des divers sites d'excision-épissage dans un pré-ARNm, on a identifié plusieurs facteurs protéiques qui contribuent à la sélection de ces sites et influencent l'utilisation des sites à variance d'une molécule de pré-ARNm. La particularité qu'ont ces facteurs d'excision-épissage à variantes de s'exprimer selon le type cellulaire conduit à un profil d'excision-épissage particulier à chaque tissu, et, ce faisant, contribue à moduler l'expression des gènes lors de l'embryogenèse et de la différenciation cellulaire ; un exemple classique est la détermination du sexe chez la drosophile : l'excision-épissage en tel ou tel point d'un pré-ARNm unique fera de l'embryon un mâle ou une femelle.

Les réactions d'excision-épissage présentées jusqu'ici consistaient toutes en la jonction d'exons siégeant sur une molécule donnée de pré-ARNm. On connaît une curieuse exception, le ***trans*-épissage**, où les exons réunis appartiennent à des transcrits différents ; on en fit la découverte chez les trypanosomes ; tous leurs ARNm comportent, à leur bout 5', une même séquence-guide, expulsée, de 35 nucléotides. Cette séquence est transcrite séparément sous forme de bout 5' d'un ARN de 137 nucléotides, puis est jointe au sites d'excision-épissage 3' de divers pré-ARNm *via* une réaction de *trans*-épissage (figure 6.47). Ces réactions existent aussi chez des nématodes (par exemple *C. elegans*) et chez *Euglena*. En outre, les cellules de mammifères sont capables d'effectuer des réactions de *trans*-épissage avec l'ARN guide excisé du nématode, ce qui indique que les mammifères possèdent eux aussi la machinerie de *trans*-épissage, notamment certaines au moins des RNPpn requises lors du *cis*-épissage normal des pré-ARNm nucléaires. On ignore cependant la portée de ce *trans*-épissage pour les eucaryotes supérieurs, en particulier pour les mammifères.

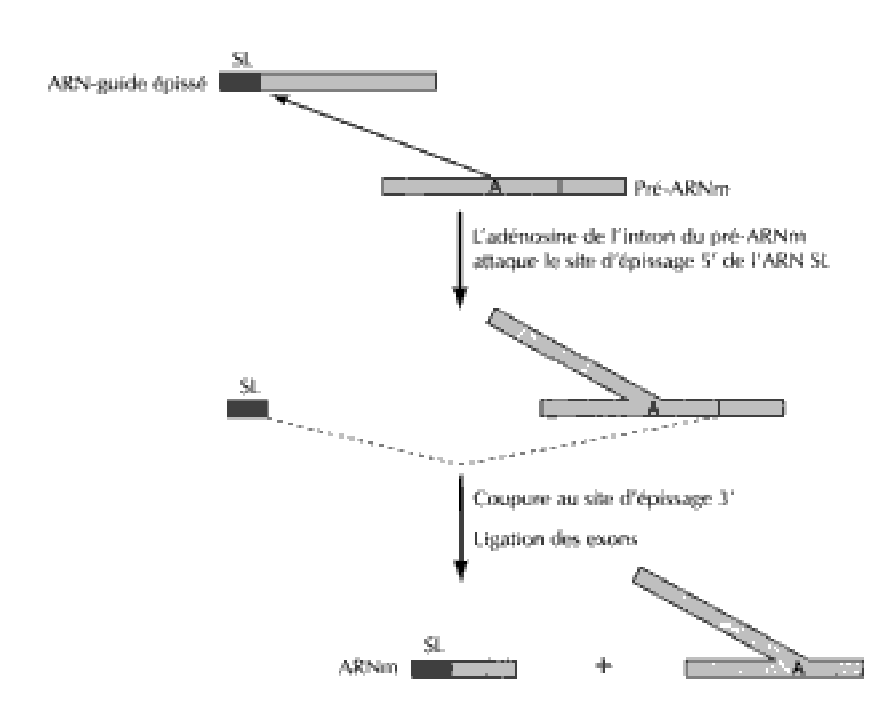


Figure 6.47
Trans-épissage. Les réactions impliquées dans le *trans*-épissage sont semblables à celles des processus d'excision-épissage ordinaires, sauf que dans un *trans*-épissage les exons qui sont réunis appartiennent à deux molécules d'ARN différentes. Le site d'épissage 5' de l'ARN-guide épissé (SL) se scinde par réaction avec un résidu adénosine de l'intérieur de l'intron du pré-ARNm. Ensuite le site d'épissage 3' est coupé pendant que SL et les exons du pré-ARNm sont soudés.

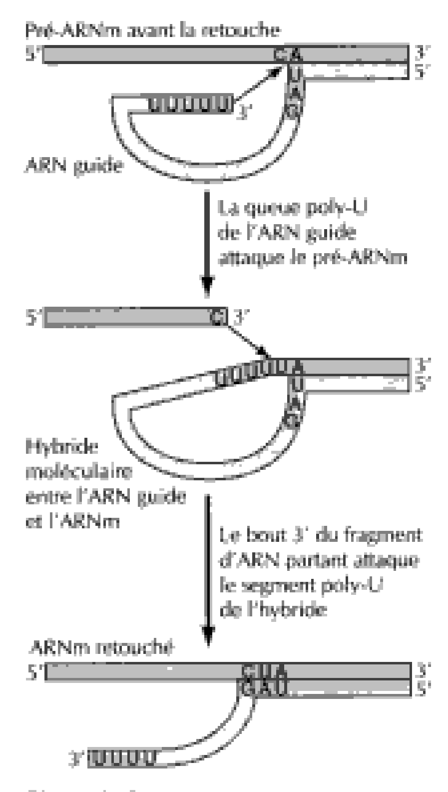


Figure 6.48
Modèle de retouche des ARNm mitochondriaux chez le trypanosome. Des U sont insérés en série dans la molécule de pré-ARNm ; l'information suivie pour cette retouche est fournie par un ARN-guide complémentaire de la partie à retoucher de l'ARNm et pourvu d'une queue poly-U à son bout 3'. Dans la réaction de retouche dessinée, un unique U est inséré entre des résidus C et A du pré-ARNm. On pense que cette insertion s'effectue par coupure entre ces résidus et formation d'une molécule commune dans laquelle le bout 3' de l'ARN guide s'unit au résidu A de l'ARNm. Le bout 3' du fragment d'ARN partant attaque alors le morceau poly-U de la molécule hybride, en donnant un ARNm retouché qui contient un des résidus U de la chaîne poly-U de l'ARN guide.

Retouche des ARN

La **retouche des ARN** concerne les remaniements subis, en dehors de l'excision-épissage, par les régions de certains ARNm qui codent une protéine. Cette forme exceptionnelle de retouche fut découverte dans des ARNm mitochondriaux de trypanosomes, mais on l'a retrouvée récemment dans ceux d'autres organismes, dans les ARNm chloroplastiques de plantes supérieures et dans des ARNm nucléaires de certains mammifères.

La retouche des ARNm mitochondriaux de trypanosomes et de protozoaires apparentés consiste en addition ou élimination de résidus U en de multiples positions de la molécule d'ARN (figure 6.48). L'information d'après laquelle s'effectue la retouche siège dans des ARN-guides qui sont complémentaires aux zones remaniées de l'ARN mature. Les ARN-guide comportent des queues poly-U qui cèdent leur résidus U au cours d'une série de réactions de retouche rappelant un processus d'excision-épissage. Il arrive que la retouche frappe jusqu'à la moitié des nucléotides de l'ARN remanié.

D'autres formes de retouche, plus subtiles, consistent en des substitution d'une seule base d'un ARNm par une autre ; on en trouve des exemples dans les ARN mitochondriaux et chloroplastiques de plantes supérieures et dans les ARNm nucléaires de cellules de mammifère. L'exemple le mieux connu chez les mammifère est celui de l'ARNm d'apolipoprotéine B, une protéine qui transporte les lipides dans le sang ; dans ce cas, la retouche propre à un tissu aboutit à former deux types d'apolipoprotéine B (figure 6.49). Chez l'Homme, l'Apo-B100 (4 536 résidus) est synthétisée dans le foie par traduction d'un ARNm non retouché. Cependant, une protéine plus courte (2 152 résidus) se forme dans la paroi intestinale, par traduction d'un ARNm retouché dans lequel un résidu C a été remplacé par un U ; cette substitution transforme le codon glutamine (CAA) de l'ARNm originel en un codon dictant la fin de la transcription (UAA) de l'ARNm retouché, d'où la production d'une apolipoprotéine B plus courte. Le mécanisme de cette retouche met en jeu la conversion enzymatique directe d'un C en U, par désamination de la cytosine. Ce type de retouche ressemble plus aux modifications de bases de la maturation des ARNt qu'à la retouche des ARN mitochondriaux de trypanosomes. La retouche, propre à chaque tissu, de l'ARNm d'apolipoprotéine B mène à l'expression de protéines dont la structure et la fonction sont différentes dans le foie et dans l'intestin : la grande Apo-B100 produite par le foie véhicule les lipides dans le courant sanguin, l'Apo-B48 sert à l'absorption des lipides alimentaires par l'épithélium intestinal.

Dégradation des ARN

Les étapes de maturation présentées ci-avant mènent à la formation d'ARNm matures, qui gouvernent la synthèse des protéines. On peut cependant considérer la future destruction de la molécule d'ARN comme l'ultime stade de son remaniement par la cellule. Comme le taux intracellulaire d'un ARN donné résulte d'un équilibre entre sa synthèse et sa destruction, la vitesse à laquelle cet ARN est détruit constitue un stade supplémentaire où l'expression d'un gène peut être modulée. Les ARN ribosomiaux et les ARN de transfert sont très stables, ce qui rend compte de leur taux élevé (supérieur à 90 % de l'ensemble des ARN) tant dans les cellules de procaryotes que dans celles d'eucaryotes. Par contre, les ARNm bactériens sont vite détruits, leur demi-vie ne dépassant guère 2 à 3 minutes. Ce renouvellement rapide des ARNm permet à la bactérie de répondre rapidement aux fluctuations de son environnement, notamment à la concentration de nutriments qui lui sont indispensables. Cependant, dans les cellules d'eucaryotes, la vitesse de destruction est propre à chaque ARNm, ce qui un autre moyen encore de moduler l'expression d'un gène.

La destruction de la plupart des ARNm d'eucaryotes débute par un raccourcissement de leur queue poly-A, puis continue par élimination de la coif-

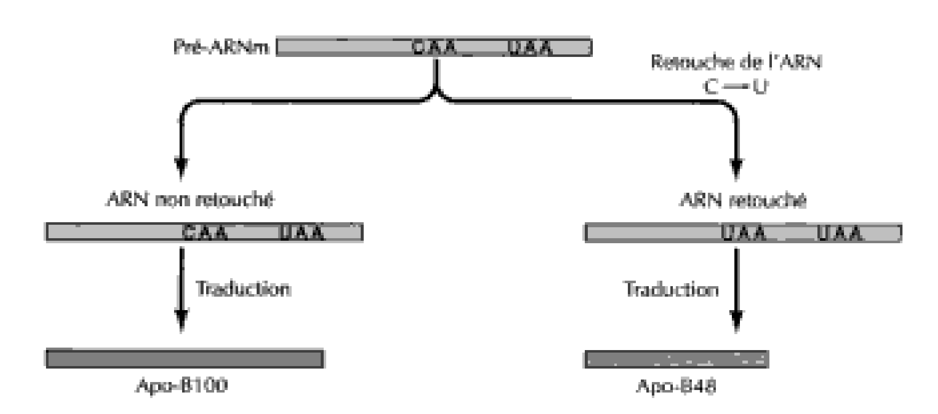
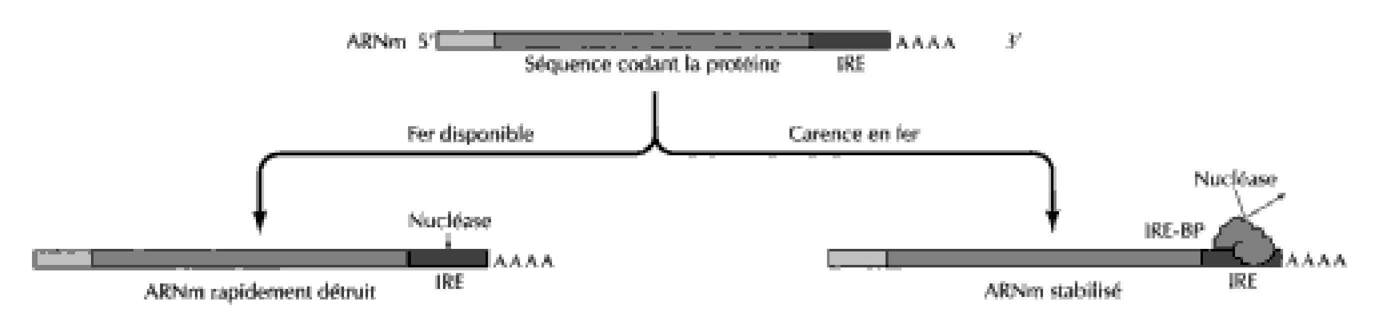


Figure 6.49
Retouche de l'ARNm d'apolipoprotéine B. Dans le foie humain, l'ARNm échappe à la retouche et est traduit en une protéine de 4 536 résidus appelée Apo-B100. Dans la paroi de l'intestin humain, l'ARNm est retouché par une modification de base qui transforme un C en U. Ceci transforme un codon glutamine (CAA) en un codon de terminaison (UAA), ce qui résulte en la synthèse d'une chaîne protéique plus courte (Apo-B48), ne comportant que 2 152 résidus.

fe 5' et la dépolymérisation de l'ARN par des nucléases attaquant par les deux bouts. La demi-vie des ARNm de mammifère va de 30 minutes à environ 20 heures ; les ARNm à vie courte codent souvent des protéines régulatrices, notamment certains facteurs de transcription dont le taux intracellulaire suit de près les stimuli de l'environnement. Ces ARNm comportent souvent à leur bout 3' des séquences enrichies en AU, qui dictent, semble-t-il, une rapide destruction puisqu'elles provoquent une désadénylylation.

La stabilité de certains ARNm répond aussi à des signaux extracellulaires. Un exemple en est offert par l'ARNm codant le récepteur de transferrine, une protéine qui capte le fer à la surface des cellules de mammifère. La densité du récepteur de transferrine à la surface de la cellule s'ajuste sur la disponibilité en fer, en grande partie par ajustement de la stabilité de son ARNm (figure 6.50). Quand la cellule est bien fournie en fer, l'ARNm du récepteur de transferrine est rapidement détruit, par action d'une nucléase sur une séquence voisine du bout 3' ; en cas de carence en fer, l'ARNm est stabilisé, le récepteur de transferrine est synthétisé en plus grande quantité et le fer mieux absorbé par la cellule. Cette régulation est due à une protéine qui s'attache à des séquences singulières (les éléments sensibles au taux de fer, IRE) du bout 3' de l'ARNm du récepteur de transferrine et le protège de la destruction. La fixation de cette protéine régulatrice aux IRE est à son tour sous la dépendance du taux de fer cellulaire : quand le fer vient à manquer, la protéine se fixe à l'IRE et empêche l'ARNm du récepteur de transferrine d'être détruit. Des changements semblables dans la stabilité d'autres ARNm servent à moduler l'expression des gènes par certaines hormones. Concluons par cette remarque : si la transcription s'avère le niveau primordial auquel l'expression des gènes est ajustée, le fait que la vitesse de destruction d'un ARNm varie joue aussi un rôle important dans l'équilibre dynamique du taux des divers ARNm d'une cellule.

Figure 6.50
Régulation de la stabilité métabolique de l'ARNm du récepteur de transferrine. Le taux d'ARNm du récepteur de transferrine dépend de la quantité de fer disponible dans la cellule. Quand le fer est abondant, l'ARNm est rapidement détruit, par une nucléase qui attaque son bout 3'. En cas de carence en fer, une protéine régulatrice (protéine se fixant à l'élément sensible au taux de fer, ou IRE-BP) se fixe à une séquence voisine du bout 3' de l'ARNm (l'élément sensible au taux de fer, ou IRE) et, ce faisant, protège l'ARNm d'un clivage par la nucléase.



TERMES CLÉS

ARN polymérase, promoteur, prise d'empreintes

opéron, opérateur, répresseur, éléments de commande en *cis*, facteur actif en *trans*

atténuation transcriptionnelle

facteur de transcription, facteur de transcription général, boîte TATA, protéine se fixant à la boîte TATA (TBP), facteur attaché à TBP (TAF)

amplificateur

épreuve de freinage, chromatographie d'affinité sur ADN

activateur de transcription, domaine en doigt de gant à zinc, récepteur d'hormone stéroïde, hélice-coude-hélice, homéodomaine, homéoboîte, tirette à leucines, hélice-boucle-hélice

Résumé

TRANSCRIPTION CHEZ LES PROCARYOTES

ARN polymérase et transcription : L'ARN polymérase de *E. coli* comprend les protomères α, β, β' et σ. La transcription commence quand σ se fixe à une séquence du promoteur ; quand quelques nucléotides ont été polymérisés en ARN, le cœur de la polymérase se détache de σ et se met à glisser sur la matrice en allongeant le chaîne d'ARN jusqu'à ce qu'elle rencontre un signal de terminaison.

Répresseurs et ralentissement de la transcription : Le prototype des régulateurs de l'expression d'un gène chez les bactéries est l'opéron *lac*, ajusté par la fixation d'un répresseur propre à des séquences d'ADN voisines du promoteur.

Régulation positive de la transcription : Certains gènes bactériens sont modulés par des activateurs de transcription et non par des répresseurs de transcription.

Atténuation de la transcription : La transcription est parfois ajustée par un processus qui rend la polymérase capable de sauter un site particulier de la matrice d'ADN.

ARN POLYMÉRASES D'EUCARYOTES ET FACTEURS DE TRANSCRIPTIONS GÉNÉRAUX

ARN polymérases d'eucaryotes : La cellule d'eucaryote possède trois ARN polymérases nucléaires qui transcrivent les gènes d'ARNm (polymérase II), d'ARNr (polymérase I) et d'ARNt (polymérase III).

Facteurs de transcription généraux et démarrage de la transcription par l'ARN polymérase II : Les ARN polymérases d'eucaryote se fixent aux séquences du promoteur non directement, mais par l'intermédiaire d'autres protéines, les facteurs de transcription généraux. Les séquences du promoteur de nombreux gènes transcrits par la polymérase II sont reconnues par la protéine se fixant à la boîte TATA, protéine qui attire sur le promoteur d'autres facteurs de transcription ainsi que l'ARN polymérase.

Transcription par les ARN polymérases I et III : Les ARN polymérases I et III exigent leurs propres facteurs de transcription, qui s'attachent au promoteur des gènes d'ARNr et d'ARNt.

RÉGULATION DE LA TRANSCRIPTION CHEZ LES EUCARYOTES

Séquences régulatrices actives en* cis *: promoteurs et amplificateurs : La transcription des gènes d'eucaryotes est commandée par des protéines qui se fixent à des séquences régulatrices siégeant parfois à des milliers de bases du site de départ de la transcription. Les amplificateurs comportent des sites d'attache pour de nombreuses protéines qui agissent de concert pour moduler l'expression d'un gène.

Protéines à pouvoir modulateur sur la transcription : À partir d'extraits nucléaires d'eucaryotes, on a purifié maints facteurs de transcription grâce à leur attachement à des séquences singulières d'ADN.

Structure et fonctionnement des activateurs transcriptionnels : Les activateurs de transcription sont des protéines composites, faites d'un domaine se fixant à l'ADN et d'un domaine d'activation. Le domaine de fixation à l'ADN leur permet de reconnaître des séquences régulatrices particulières, le domaine d'activation de stimuler la transcription en s'attachant aux facteurs de transcription généraux.

Répresseurs eucaryotiques : L'expression des gènes d'eucaryotes dépend non seulement d'activateurs, mais aussi de répresseurs. Certains répresseurs interfèrent avec l'attachement à l'ADN des activateurs ou des facteurs de transcription généraux. D'autres répresseurs comportent des domaines répresseurs discrets qui inhibent la transcription par leur attachement à des facteurs de transcription généraux ou à des activateurs de transcription.

Rapport de la structure chromatinienne avec la transcription : L'empaquetage de l'ADN en nucléosomes dans les cellules d'eucaryotes fait obstacle à la transcription. Des facteurs de remodelage des nucléosomes démembrent la structure chromatinienne et permettent aux facteurs de transcription d'atteindre les séquences d'ADN des amplificateurs et des promoteurs. Dès lors, l'ARN polymérase transcrit à travers les nucléosomes en dissociant les histones d'avec l'ADN. Ce mode de transcription est facilité par les protéines chromosomiques non histones HMG-14 et HMG-17, qu'on trouve concentrées sur les gènes activement transcrits.

HMG-14, HMG-17, facteur de remodelage du nucléosome, site hypersensible à l'ADNase

Méthylation de l'ADN : La méthylation des résidus cytosine est capable d'empêcher la transcription de certains gènes de vertébrés. La régulation de l'expression génique par méthylation joue un rôle important dans l'estampillage génomique, qui commande la transcription de certains gènes en jeu dans le développement embryonnaire des mammifères.

estampillage génomique

MATURATION ET RENOUVELLEMENT DES ARN

Maturation des ARN ribosomiaux et des ARN de transfert : Les ARNr et les ARNt de procaryotes et d'eucaryotes sont issus de coupures dans de longs transcrits primaires. Les ARNr reçoivent des groupes méthyle et diverses bases sont modifiées dans les ARNt.

préARNr, pré-ARNt, ARNase P, ribozyme

Maturation des ARNm d'eucaryotes : Outre l'excision de leurs introns, les pré-ARNm d'eucaryotes sont modifiés par greffage d'une coiffe 7-méthylguanosine et d'une queue poly-A.

pré-ARNm, coiffe de 7-méthylguanosine, queue poly-A, poly-adénylation

Mécanismes de l'excision-épissage : L'excision-épissage des pré-ARNm nucléaires a lieu au sein de grands complexes appelés particules d'épissage, composées de protéines et de petits ARN nucléaires (ARNpn). Ces ARNpn reconnaissent des séquences du site d'épissage des pré-ARNm et catalysent la réaction d'excision-épissage. Certains ARN de mitochondries, de chloroplastes et de bactéries subissent un auto-épissage dans lequel la réaction catalytique s'effectue *via* des séquences de l'intron.

particule d'épissage, petit ARN nucléaire (ARNpn), RNPpn, auto-épissage

Variantes de l'excision-épissage des pré-ARNm : Des exons sont parfois unis selon des combinaisons variées au cours de l'épissage à choix multiples ; cela présente un avantage notable pour une commande de l'expression génique propre à chaque tissu d'eucaryote supérieur. Chez certains eucaryotes plus simples, un *trans*-épissage aboutit à souder des exons issus de deux transcrits primaires différents.

épissage à choix multiples, *trans*-épissage

Retouche des ARN : Certains ARNm subissent des remaniements qui changent leurs séquences codant une protéine. Les retouches frappant les ARNm mitochondriaux de certains protozoaires consistent en l'addition et la délétion de résidus U en divers endroits de la molécule. Chez les plantes et les mammifères, on connaît d'autre espèces de retouches, notamment la modification de bases particulières.

retouche de l'ARN

Destruction des ARN : Chacun des ARNm de cellules d'eucaryotes est détruit à une vitesse caractéristique, ce qui offre un autre mode de régulation de l'expression des gènes. Parfois, la destruction d'un ARNm est sous la commande de signaux extracellulaires.

QUESTIONNAIRE

1. La séquence consensus de l'élément -10 du promoteur chez *E. coli* est TATAAT. Vous comparez deux promoteurs dont les éléments -10 ont respectivement les séquences TATGAT et CATGAT. Lequel sera le meilleur promoteur ?

2. Vous étudiez deux souches de *E. coli* ; l'une possède le gène sauvage de β-galactosidase et une mutation i^-, l'autre un gène de β-galactosidase thermosensible et une mutation o^c. Après conjugaison de ces souches, vous cherchez une production de β-galactosidase aux températures permissive et non permissive en l'absence de lactose. Qu'allez-vous observer ?

3. Vous comparez deux gènes reconnus par la polymérase II quant à leurs exigences de transcription de base *in vitro*, l'un pourvu d'une boîte TATA, l'autre pourvu seulement d'une séquence Inr. La transcription à partir de ces promoteurs exige-t-elle TBP ou TFIID ?

4. Vous étudiez l'amplificateur d'un gène qui ne s'exprime normalement que dans les neurones. Les constructions recombinantes dans lesquelles cet amplificateur est soudé à un gène espion s'expriment dans les neurones, mais pas dans les fibroblastes. Cependant, si vous mutez un certain élément de séquence dans l'amplificateur, vous observez que le gène s'exprime à la fois dans les fibroblastes et dans les neurones. Quel type de protéine régulatrice vous attendez-vous à voir se fixer à cet élément de l'amplificateur ?

5. On observe qu'un facteur de transcription agit en s'attachant à diverses séquences d'ADN de cellules musculaires et d'hépatocytes. Comment imaginer qu'un mécanisme d'excision-épissage à choix multiples puisse déterminer ce type d'activation propre à un tissu ?

POUR EN SAVOIR PLUS

Références générales

McKnight, S. L. and K. R Yamamoto, eds. 1992. *Transcriptional Regulation*. Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Ptashne, M. 1992. *A Genetic Switch*. 2nd ed. Cambridge, MA.: Cell Press and Blackwell Scientific Publications.

Ptashne, M. & Gann, A. 1997. Transcriptional activation by recruitement. *Nature* **386**:569.[R]

Tjian, R. 1995. La transcription des gènes. *Pour la Science* **210**:50.[R]

Transcription chez les procaryotes

Burgess, R. R., A. A. Travers, J. J. Dunn and E. K. F. Bautz. 1969. Factor stimulating transcription by RNA polymerase. *Nature* 221: 43–44. [P]

Busby, S. and R. H. Ebright. 1994. Promoter structure, promoter recognition, and transcription activation in prokaryotes. *Cell* 79: 743–746. [R]

Dombruski, A. J., W. A. Walter, M. T. Record Jr., D. A. Siegele and C. A Gross. 1992. Polypeptides containing highly conserved regions of transcription initiation factor s ^{70} exhibit specificity of binding to promoter DNA. *Cell* 70: 501–512. [P]

Englesberg, E., J. Irr, J. Power and N. Lee. 1965. Positive control of enzyme synthesis by gene C in the L-arabinose system. *J. Bacteriol*. 90: 946–957. [P]

Gilbert, W. and B. Muller-Hill. 1966. Isolation of the *lac* repressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 56: 1891–1899. [P]

Jacob, F. and J. Monod. 1961. Genetic and regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol*. 3: 318–356. [P]

Kolb, A., S. Busby, H. Buc, S. Garges and S. Adhya. 1993. Transcriptional regulation by cAMP and its receptor protein. *Ann. Rev. Biochem*. 62: 749–795. [R]

Lewis, M., G. Chang, N. C. Horton, M. A. Kercher, H. C. Pace, M. A. Schumacher, R. G. Brennan and P. Lu. 1996. Crystal structure of the lactose operon repressor and its complexes with DNA and inducer. *Science* 271: 1247–1254. [P]

Pardee, A. B., F. Jacob and J. Monod. 1959. The genetic control and cytoplasmic expression of "inducibility" in the synthesis of b-galactosidase by *E. coli*. *J. Mol. Biol*. 1: 165–178. [P]

Yanofsky, C. 1981. Attenuation in the control of expression of bacterial operons. *Nature* 289: 751–758. [R]

ARN polymérases d'eucaryotes et facteurs de transcription généraux

Buratowski, S. 1994. The basics of basal transcription by RNA polymerase II. *Cell* 77: 1–3. [R]

Conaway, R. C. and J. C. Conaway. 1993. General initiation factors for RNA polymerase II. *Ann. Rev. Biochem*. 62: 161–190. [R]

Drapkin, R. and D. Reinberg. 1994. The multifunctional TFIIH complex and transcriptional control. *Trends Biochem. Sci*. 19: 504–508. [R]

Geiduschek, E. P. and G. P. Tocchini-Valentini. 1988. Transcription by RNA polymerase III. *Ann. Rev. Biochem*. 57: 873–914. [R]

Hernandez, N. 1993. TBP, a universal eukaryotic transcription factor? *Genes Dev*. 7: 1291–1308. [R]

Koleske, A. J. and R. A. Young. 1995. The RNA polymerase II holoenzyme and its implications for gene regulation. *Trends Biochem. Sci*. 20: 113–116. [R]

Matsui, T., J. Segall, P. A. Weil and R. G. Roeder. 1980. Multiple factors are required for accurate initiation of transcription by purified RNA polymerase II. *J. Biol. Chem*. 255: 11992–11996. [P]

Nikolov, D. B., H. Chen, E. D. Halay, A. A. Usheva, K. Hisatake, D. K. Lee, R. G. Roeder and S. K. Burley. 1995. Crystal structure of a TFIIB-TBP-TATA-element ternary complex. *Nature* 377: 119–128. [P]

Pugh, B. F. and R. Tjian. 1992. Diverse transcriptional functions of the multisubunit eukaryotic TFIID complex. *J. Biol. Chem*. 267: 679–682. [R]

Sharp, P. A. 1992. TATA-binding protein is a classless factor. *Cell* 68: 819–821. [R]

Weil, P. A., D. S. Luse, J. Segall and R. G. Roeder. 1979. Selective and accurate transcription at the Ad2 major late promoter in a soluble system dependent on purified RNA polymerase II and DNA. *Cell* 18: 469–484. [P]

Young, R. A. 1991. RNA polymerase II. *Ann. Rev. Biochem*. 60: 689–715. [R]

Zawel, L. and D. Reinberg. 1995. Common themes in assembly and function of eukaryotic transcription complexes. *Ann. Rev. Biochem*. 64: 533–561. [R]

Régulation de la transcription chez les eucaryotes

Adams, C. C. and J. L. Workman. 1993. Nucleosome displacement in transcription. *Cell* 72: 305–308. [R]

Atchison, M. L. 1988. Enhancers: mechanisms of action and cell specificity. *Ann. Rev. Cell. Biol*. 4: 127–153. [R]

Banerji, J., S. Rusconi and W. Schaffner. 1981. Expression of a b-globin gene is enhanced by remote SV40 DNA sequences. *Cell* 27: 299–308. [P]

Barlow, D. P. 1995. DNA methylation and genomic imprinting. *Cell* 77: 473–476. [R]

Beato, M., P. Herrlich and G. Schutz. 1995. Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell* 83: 851–857. [R]

Bird, A. 1992. The essentials of DNA methylation. *Cell* 70: 5–8. [R]

Brent, R. and M. Ptashne. 1985. A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor. *Cell* 43: 729–736. [P]

Buratowski, S. 1995. Mechanisms of gene activation. *Science* 270: 1773–1774. [R]

Choy, B. and M. R. Green. 1993. Eukaryotic activators function during multiple steps of preinitiation complex assembly. *Nature* 366: 531–536. [P]

Cohen, J. & Hogan, M. 1995. Le blocage des gènes. *Pour la Science* **208**:34.

Diederich, M. *et al.* 1997. Vers la traduction du message des régions non traduites : régulation et pathologie moléculaire. *Médecine/Sciences* **13**:1266.[R]

Dynan, W. S. and R. Tjian. 1983. The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter. *Cell* 35: 79–87. [P]

Felsenfeld, G. 1992. Chromatin as an essential part of the transcriptional mechanism. *Nature* 355: 219–224. [R]

Gehring, W. J., Y. Q. Qian, M. Billeter, K. Furukubo-Tokunaga, A. F. Schier, D. Resendez-Perez, M. Affolter, G. Otting and K. Wuthrich. 1994. Homeodomain-DNA recognition. *Cell* 78: 211–223. [R]

Goodrich, J. A., G. Cutler, and R. Tjian. 1996. Contacts in context: Promoter specificity and macromolecular interactions in transcription. *Cell* 84: 825–830. [R]

Grunstein, M. 1997. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* **389**:349.

Grunstein, M. 1992. Histones as regulators of genes. *Sci. Amer.* 267(4): 68–74B. [R]

Hanna-Rose, W. and U. Hansen. 1996. Active repression mechanisms of eukaryotic transcription repressors. *Trends Genet.* 12: 229–234. [R]

Johnson, A. D. 1995. The price of repression. *Cell* 81: 655–658. [R]

Johnson, P. F. and S. L. McKnight. 1989. Eukaryotic transcriptional regulatory proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 58: 799–839. [R]

Kadonaga, J. T. and R. Tjian. 1986. Affinity purification of sequence-specific DNA binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 5889–5893. [P]

Kornberg, R. D. and Y. Lorch. 1992. Chromatin structure and transcription. *Ann. Rev. Cell Biol.* 8: 563–587. [R]

Levine, M. and J. L. Manley. 1989. Transcriptional repression of eukaryotic promoters. *Cell* 59: 405–408. [R]

Licht, J. D., M. J. Grossel, J. Figge and U. M. Hansen. 1990. *Drosophila Kruppel* protein is a transcriptional repressor. *Nature* 346: 76–79. [P]

Maniatis, T., S. Goodbourn and J. A. Fischer. 1987. Regulation of inducible and tissue-specific gene expression. *Science* 236: 1237–1244. [R]

McGinnis, W. and R. Krumlauf. 1992. Homeobox genes and axial patterning. *Cell* 68: 283–302. [R]

McKnight, S. L. and R. Kingsbury. 1982. Transcriptional control signals of a eukaryotic protein-coding gene. *Science* 217: 316–324. [P]

Mitchell, P. and R. Tjian. 1989. Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* 245: 371–378. [R]

Pabo, C. O. and R. T. Sauer. 1992. Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. *Ann. Rev. Biochem.* 61: 1053–1095. [R]

Paranjape, S. M., R. T. Kamakaka and J. T. Kadonaga. 1994. Role of chromatin structure in the regulation of transcription by RNA polymerase II. *Ann. Rev. Biochem.* 63: 265–297. [R]

Peterson, C. L. and J. W. Tamkun. 1995. The SWI-SNF complex: A chromatin remodeling machine? *Trends Biochem. Sci.* 20: 143–146. [R]

Ptashne, M. 1988. How eukaryotic transcriptional activators work. *Nature* 335: 683–689. [R]

Razin, A. and H. Cedar. 1994. DNA methylation and genomic imprinting. *Cell* 77: 473–476. [R]

Roberts, S. G. E. and M. R. Green. 1994. Activator-induced conformational change in general transcription factor TFIIB. *Nature* 371: 717–720. [P]

Sauer, F., S. K. Hansen and R. Tjian. 1995. Multiple TAF_{II}s directing synergistic activation of transcription. *Science* 270: 1783–1788. [P]

Staudt, L. M. and M. J. Lenardo. 1991. Immunoglobulin gene transcription. *Ann. Rev. Immunol.* 9: 373–398. [R]

Tjian, R. and T. Maniatis. 1994. Transcriptional activation: a complex puzzle with few easy pieces. *Cell* 77: 5–8. [R]

Wolffe, A. P. 1994. Transcription: In tune with the histones. *Cell* 77: 13–16. [R]

Maturation et renouvellement des ARN

Beelman, C. A. and R. Parker. 1995. Degradation of mRNA in eukaryotes. *Cell* 81: 179–183. [R]

Berget, S. M. 1995. Exon recognition in vertebrate splicing. *J. Biol. Chem.* 270: 2411–2414. [R]

Cech, T. R. 1990. Self-splicing of group I introns. *Ann. Rev. Biochem.* 59: 543–568. [R]

Curtis, D., R. Lehmann and P. D. Zamore. 1995. Translational regulation in development. *Cell* 81: 171–178. [R]

Ferré-D'Amaré, A. R. *et al.* 1998. Crystal structure of a hepatitis delta virus ribozyme. *Nature* **395**:567-574.[O] + commentaire p. 548

Foulkes, N. S. and P. Sassone-Corsi. 1992. More is better: activators and repressors from the same gene. *Cell* 68: 411–414. [R]

Gerlach, W. L. & Robaglia, Ch. 1992. Les ribozymes. *La Recherche* n° 247:1144.[R]

Green, M. R. 1991. Biochemical mechanisms of constitutive and regulated pre-mRNA splicing. *Ann. Rev. Cell Biol.* 7: 559–599. [R]

Guerrier-Takada, C., K. Gardiner, T. Marsh, N. Pace and S. Altman. 1983. The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell* 35: 849–857. [P]

Guthrie, C. 1991. Messenger RNA splicing in yeast: clues to why the spliceosome is a ribonucleoprotein. *Science* 253: 157–163. [R]

Hopper, A. K. and N. C. Martin. 1992. Processing of yeast cytoplasmic and mitochondrial precursor tRNAs. In *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast* Saccharomyces: *Gene Expression*. E. W. Jones, J. R. Pringle and J. R. Broach, eds. pp. 99–141. Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. [R]

Keller, W. 1995. No end yet to messenger RNA 3' processing! *Cell* 81: 829–832. [R]

Klausner, R. D., T. A. Rouault and J. B. Harford. 1993. Regulating the fate of mRNA: The control of cellular iron metabolism. *Cell* 72: 19–28. [R]

Kruger, K., P. J. Grabowski, A. Zaug, A. J. Sands, D. E. Gottschling and T. R. Cech. 1982. Self-splicing RNA: Autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of *Tetrahymena*. *Cell* 31: 147–157. [P]

Maniatis, T. 1991. Mechanisms of alternative pre-mRNA splicing. *Science* 251: 33–34. [R]

McKeown, M. 1992. Alternative mRNA splicing. *Ann. Rev. Cell Biol.* 8: 133–155. [R]

Nilsen, T. W. 1994. RNA–RNA interactions in the spliceosome: Unraveling the ties that bind. *Cell* 78: 1–4. [R]

Pace, N. R. and A. B. Burgin. 1990. Processing and evolution of the rRNAs. In *The Ribosome*. W. E. Hill, A. Dahlberg, R. A. Garrett, P. B. Moore, D. Schlessinger and J. R. Warner, eds. pp. 417–425. Washington, DC: American Society for Microbiology. [R]

Padgett, R. A., M. M. Konarska, P. J. Grabowski, S. F. Hardy and P. A. Sharp. 1984. Lariat RNAs as intermediates and products in the splicing of messenger RNA precursors. *Science* 225: 898–903. [P]

Padgett, R. A., S. M. Mount, J. A. Steitz and P. A. Sharp. 1983. Splicing of messenger RNA precursors is inhibited by antisera to small nuclear ribonucleoprotein. *Cell* 35: 101–107. [P]

Ruskin, B., A. R. Krainer, T. Maniatis and M. R. Green. 1984. Excision of an intact intron as a novel lariat structure during pre-mRNA splicing *in vitro*. *Cell* 38: 317–331. [P]

Sachs, A. B. 1993. Messenger RNA degradation in eukaryotes. *Cell* 74: 413–421. [R]

Scott, J. 1995. A place in the world for RNA editing. *Cell* 81: 833–836. [R]

Sharp, P. A. 1994. Split genes and RNA splicing. *Cell* 77: 805–815. [R]

Simpson, L. and O. H. Thiemann. 1995. Sense from nonsense: RNA editing in mitochondria of kinetoplastid protozoa and slime molds. *Cell* 81: 837–840. [R]

Sontheimer, E. J. and J. A. Steitz. 1993. The U5 and U6 small nuclear RNAs as active site components of the spliceosome. *Science* 262: 1989–1996. [P]

Wickens, M. 1990. In the beginning is the end: regulation of poly(A) addition and removal during early development. *Trends Biochem. Sci.* 15: 320–324. [R]

7

Synthèse et remaniement des protéines ; régulation de leur fonction

Une fois les ARNm formés et remaniés, ils subissent la traduction, c'est-à-dire servent de matrice à la synthèse des protéines. Les protéines sont les ouvrières de la plupart des processus cellulaires, car elles se chargent de la multitude des tâches indiquées par l'information codée dans l'ADN génomique ; la synthèse d'une protéine est donc l'étape finale de l'expression d'un gène. Néanmoins, la traduction d'un ARNm n'est que la première étape dans l'élaboration d'une protéine fonctionnelle, car la chaîne polypeptidique doit se reployer dans la conformation tridimensionnelle appropriée et souvent subir divers remaniements avant d'acquérir ses capacités physiologiques. Ces étapes de remaniements, notamment chez les eucaryotes, font partie intégrante du tri et du transport de chaque espèce protéique vers sa destination finale dans la cellule.

Si l'expression de la plupart des gènes est avant tout commandée au niveau de la transcription (voir chapitre 6), il arrive que l'expression d'un gène soit ajustée au niveau de la traduction ; c'est un mode important de régulation des gènes tant chez les procaryotes que chez les eucaryotes. Plus primordiaux encore sont les mécanismes qui modulent l'activité des protéines au sein de la cellule ; en effet, dès leur synthèse, la plupart des protéines répondent à des signaux extracellulaires, soit en subissant une modification covalente, soit en s'associant à d'autres molécules. En outre, le taux d'une protéine dans une cellule est réglé par la vitesse particulière à laquelle elle est dépolymérisée. Toutes les facettes du comportements cellulaire dépendent donc en fin de compte du taux et de l'activité physiologique de chacune des protéines qui composent une cellule.

TRADUCTION DES ARNm

Toute protéine se forme sur une matrice d'ARNm par un processus très bien conservé par l'évolution (étudié au chapitre 3). Les ARNm sont tous lus dans le sens 5'→3' et les chaînes polypeptidiques polymérisées en allant de leur bout aminé vers leur bout carboxyle. Chaque acide aminé est spécifié par trois bases (un codon) de l'ARNm selon un code à peu près universel. De même, les mécanismes fondamentaux de la synthèse protéique sont identiques dans toutes les cellules : la traduction incombe aux ribosomes, les ARNt servant d'adaptateurs entre la matrice d'ARNm et les résidus d'aci-

de aminé entrant dans la chaîne. La synthèse d'une protéine met donc en jeu les interactions entre trois types de molécules d'ARN, à savoir la matrice d'ARNm, des ARNt et des ARNr, ainsi que diverses protéines composant la machinerie de traduction.

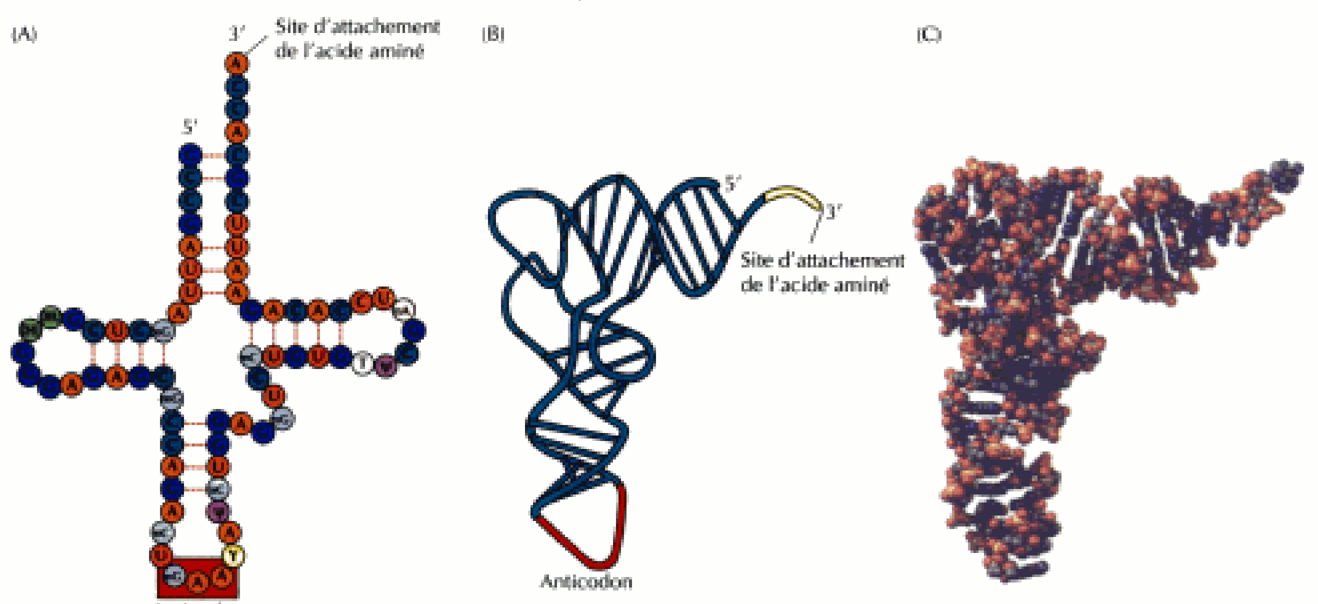
ARN de transfert

Dans le processus de traduction, chacun des 20 acides aminés doit s'aligner en face du codon correspondant de la matrice d'ARNm. Toute cellule possède une batterie d'ARNt qui servent d'adaptateurs dans ce processus ; vu qu'ils y remplissent une fonction commune, les divers ARNt sont bâtis selon le même schéma, mais chacun possède une séquence d'identification singulière qui lui permet de charger l'acide aminé adéquat et de l'amener en face du codon approprié de l'ARNm.

Les ARN de transfert sont longs de 70 à 80 nucléotides, bloqués dans une structure en feuille de trèfle caractéristique par des appariements de bases complémentaires appartenant à diverses zones de la molécule (figure 7.1). La cristallographie par les rayons X a montré que les ARNt sont tous reployés en forme de L compact, une structure requise pour que les ARNt s'adaptent au ribosome pendant le processus de traduction. La fonction d'adaptateur remplie par les ARNt dépend de deux régions distinctes de la molécule. D'une part, tous portent une séquence CCA à leur bout 3' et l'acide aminé est attaché par covalence au ribose de l'adénosine terminale. D'autre part, la matrice d'ARNm est reconnue par la boucle **anticodon**, placée à l'autre bout de l'ARNt reployé, anticodon qui se colle au codon approprié par complémentarité de bases.

L'incorporation à une protéine de l'acide aminé codé correctement exige que l'acide aminé soit joint à l'ARNt approprié et que l'appariement du codon à l'anticodon soit unique. L'attachement de chaque acide aminé à son propre ARNt s'effectue par le jeu d'un enzyme appartenant à la famille des

Figure 7.1
Structure d'un ARNt. Structure en feuille de trèfle de l'ARNt de phénylalanine de levure : forme explosée (A) montrant la complémentarité des bases associées. Les bases modifiées sont la méthylguanosine (mG), la méthylcytosine (mC), la dihydro-uridine (DHU), la ribothymidine (T), une purine modifiée, souvent l'adénosine (Y) et la pseudo-uridine (ψ). En B, on voit le squelette replié dans l'espace et en (C) le modèle compact. (C, aimablement communiqué par Dan Richardson)



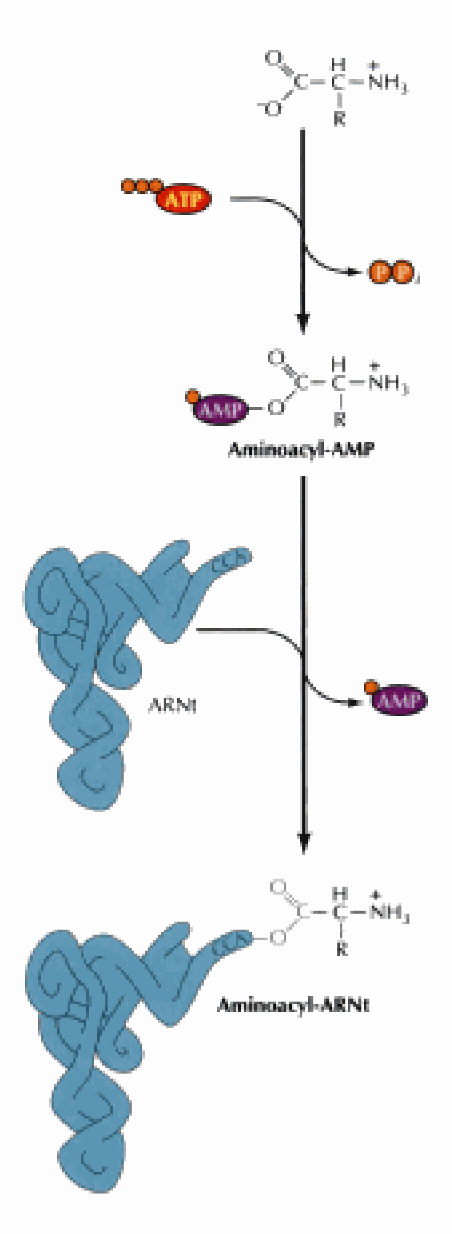


Figure 7.2
Attachement d'un acide aminé à son ARNt. Dans la première phase de la réaction, l'acide aminé est transféré à l'AMP, en donnant un intermédiaire aminoacyl-AMP ; à la seconde phase, le groupe aminoacyle est transféré au CCA du bout 3′ de l'ARNt accepteur, avec départ d'AMP. Les deux étapes sont catalysées par une aminoacyl-ARNt synthétase.

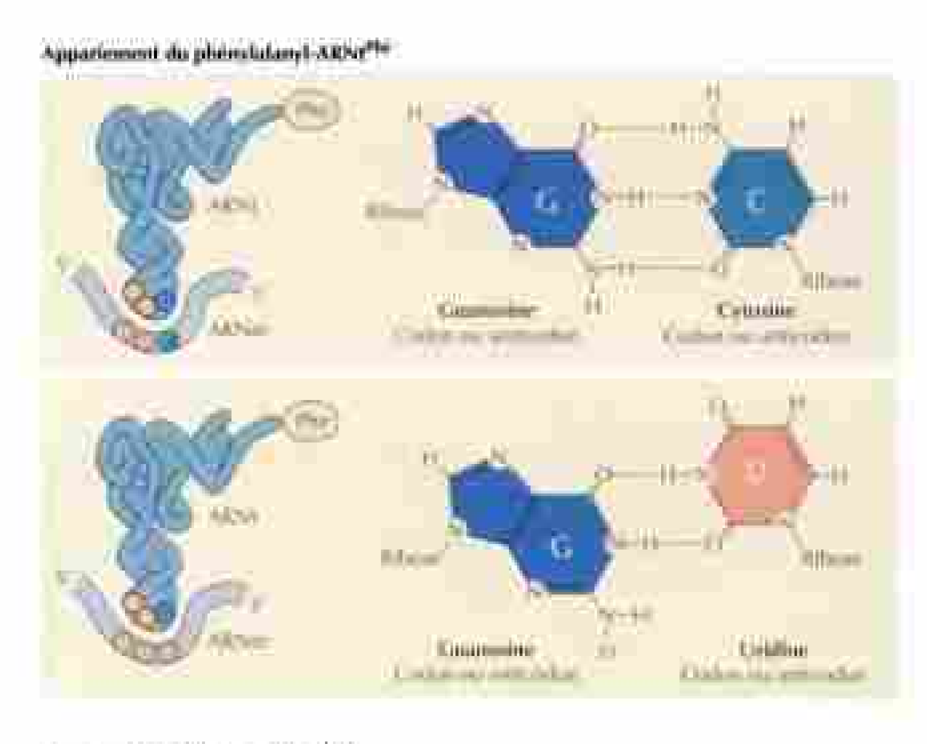
aminoacyl-ARNt synthétases, découvertes par Paul Zamecnik et Mahlon Hoagland en 1957. Chacun de ces enzymes reconnaît non seulement un seul type d'acide aminé, mais aussi le ou les ARNt appropriés auquel l'acide aminé doit être attaché. La réaction comprend deux étapes (figure 7.2) : l'acide aminé est d'abord activé par réaction avec l'ATP, en donnant un intermédiaire aminoacyl-AMP-synthétase ; l'acide aminé est ensuite greffé au bout 3′ de l'ARNt. Les aminoacyl-ARNt synthétases doivent être pourvues d'une sélectivité remarquable, car elles doivent choisir l'un des acides aminés en même temps que la séquence de bases qui caractérise l'ARNt approprié à cet acide aminé. Dans certains cas, la haute fidélité de reconnaissance d'acide aminé est due en partie à un pouvoir de relecture dans lequel tout aminoacyl-AMP incorrectement chargé sera hydrolysé plutôt que d'être greffé à l'ARNt dans la seconde étape de la réaction. La reconnaissance de l'ARNt correct par l'aminoacyl-ARNt synthétase est également très sélective : l'enzyme reconnaît la séquence nucléotidique singulière (comprenant souvent l'anticodon) qui identifie chaque espèce d'ARNt.

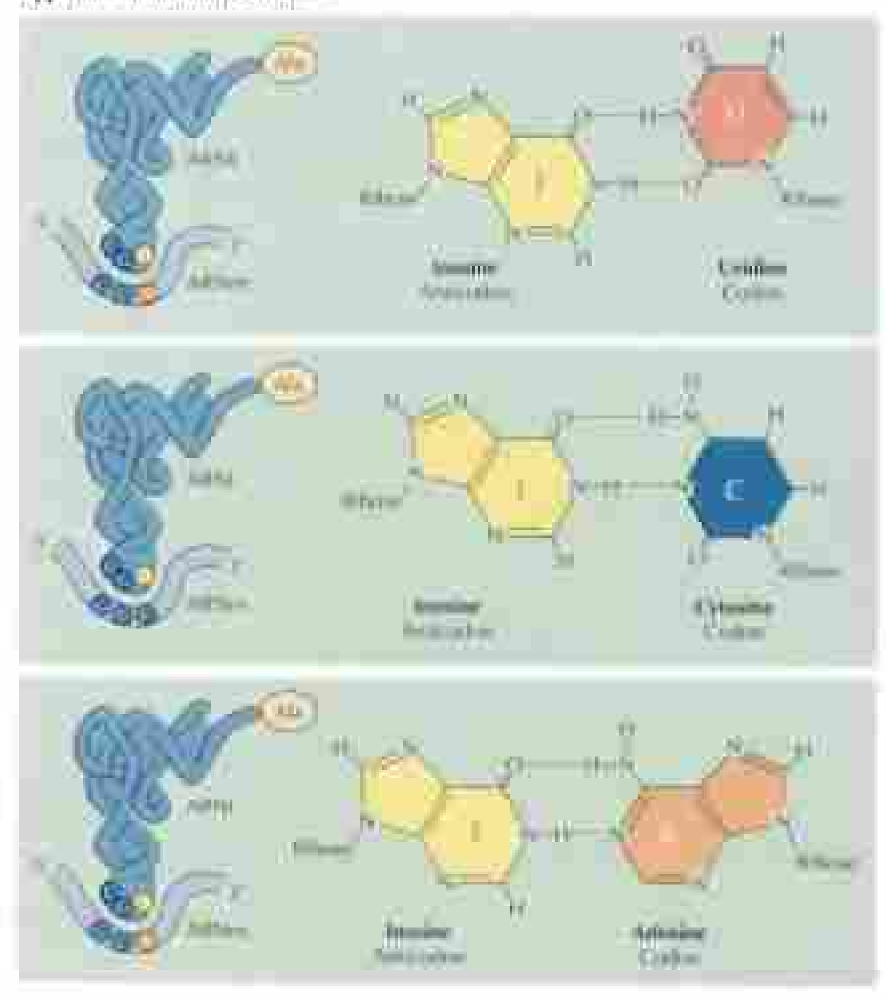
Une fois attaché à un ARNt, l'acide aminé va trouver sa place sur la matrice d'ARNm grâce à la complémentarité de bases entre le codon de l'ARNm et l'anticodon de l'ARNt ; l'appariement codon-anticodon n'est pas aussi strict que l'appariement classique A-U et G-C décrit dans les chapitres précédents ; cette anomalie est due à ce que la reconnaissance du codon par l'anticodon est en rapport avec la redondance du code génétique. Parmi les 64 codons potentiels, trois sont des codons stop, qui dictent la fin de la traduction ; les 61 autres codent un acide aminé (voir tableau 3.1). La plupart des acides aminés sont donc codés par plus d'un codon ; cette redondance est due en partie au fait que beaucoup d'acides aminés s'attachent à plus d'une espèce d'ARNt. Chez *E. coli*, par exemple, il existe environ 40 espèces d'ARNt qui servent d'accepteurs à 20 espèces d'acides aminés. En outre, certains ARNt peuvent reconnaître plus d'un codon sur l'ARNm, à cause d'un appariement de bases non canonique (flottement) entre la première position de l'anticodon de l'ARNt et la troisième position de certains codons complémentaires (figure 7.3). La lâcheté de l'appariement à cet endroit est due en partie à la formation de paires de bases G-U et en partie à ce que la guanosine devient une inosine dans les anticodons de plusieurs ARNt au cours du remaniement (voir figure 6.38). Comme l'inosine peut s'apparier avec C, U ou A à la troisième position de l'anticodon, sa présence dans un anticodon fait qu'un ARNt donné reconnaît trois codons différents dans une matrice d'ARNm.

Le ribosome

Le **ribosome** est le site de la synthèse des protéines chez les procaryotes et les eucaryotes. Reconnus d'abord en tant que particules dans les fractions d'ultracentrifugation de lysats cellulaires, les ribosomes appartiennent à diverses classes, selon leur vitesse de sédimentation, soit 70S pour les ribosomes bactériens et 80S pour ceux des cellules d'eucaryote. Les deux espèces se composent de deux éléments distincts, chacun avec ses protéines et ses **ARNr** particuliers. Le fait que les cellules sont bourrées de ribosomes montre que la synthèse des protéines revêt une grande importance dans le métabolisme cellulaire. Une cellule de *E. coli*, par exemple, contient près de 20 000 ribosomes, soit environ 25 % du poids sec de la cellule ; une cellule de mammifère en cours de prolifération en contient environ 10 millions.

Figure 7.3
Appariement non canonique d'un anticodon à un codon. L'appariement à la troisième base d'un codon est assez lâche : il permet à G de s'apparier à U et à l'inosine (I) d'un anticodon de s'apparier à U, à C ou à A. Voici deux cas d'appariement anormal, un qui permet au phényl-ARNt^{Phe} de reconnaître soit le codon UUC, soit le codon UUU, l'autre à l'alanyl-ARNt^{Ala} de reconnaître aussi bien GCU que GCC ou GCA.

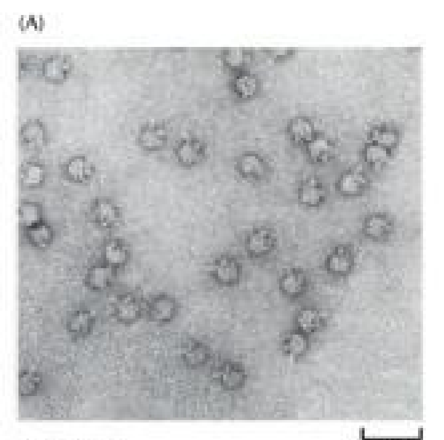


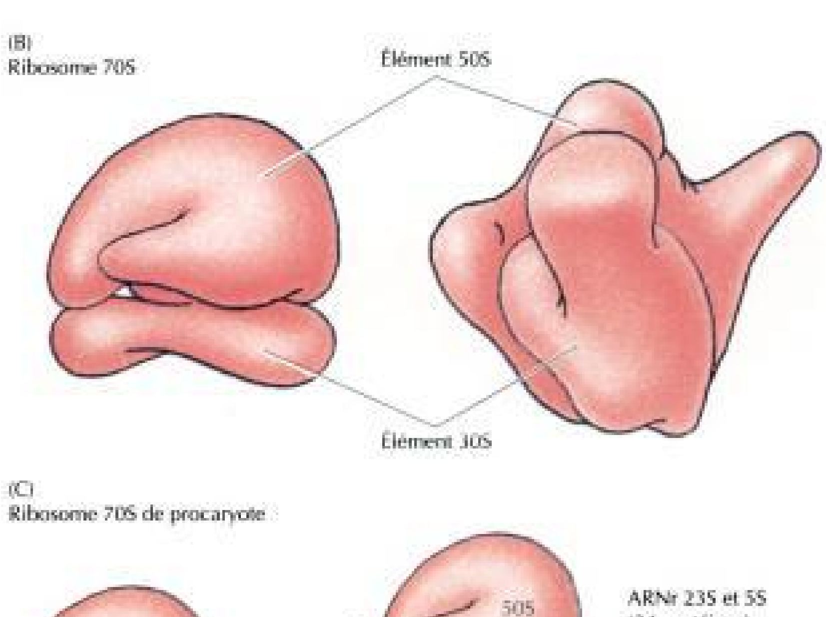


À quelques détails près, la structure du ribosome de procaryote est semblable à celle du ribosome d'eucaryote (figure 7.4). Le petit élément (désigné 30S) du ribosome de *E. coli* est fait d'un ARNr 16S et de 21 protéines, le grand élément (50S) se compose des ARNr 23S et 5S et de 34 protéines. Chaque ribosome comporte un exemplaire de chaque ARNr et de chaque protéine, à une exception près : une protéine est présente en quatre exemplaires dans l'élément 50S. Les éléments du ribosome d'eucaryote sont plus volumineux et contiennent plus de protéines que leur pendant procaryotique. Leur petit élément (40S) comprend un ARNt 18S et près de 30 protéines, le grand élément (60S) les ARNr 28S, 5,8S et 5S ainsi que 45 protéines.

Un trait remarquable du ribosome est qu'on peut le reconstituer *in vitro* à partir de ses constituants ribonucléotidiques et protéiques ; comme l'a montré Masayasu Nomura en 1968, en mélangeant dans les conditions choisies les protéines ribosomiales et les ARNr purifiés, on obtient un ribosome fonctionnel. Quoique l'assemblage du ribosome *in vivo* (notamment chez les eucaryotes) soit un processus très élaboré, la faculté qu'on a de les réas-

(A)





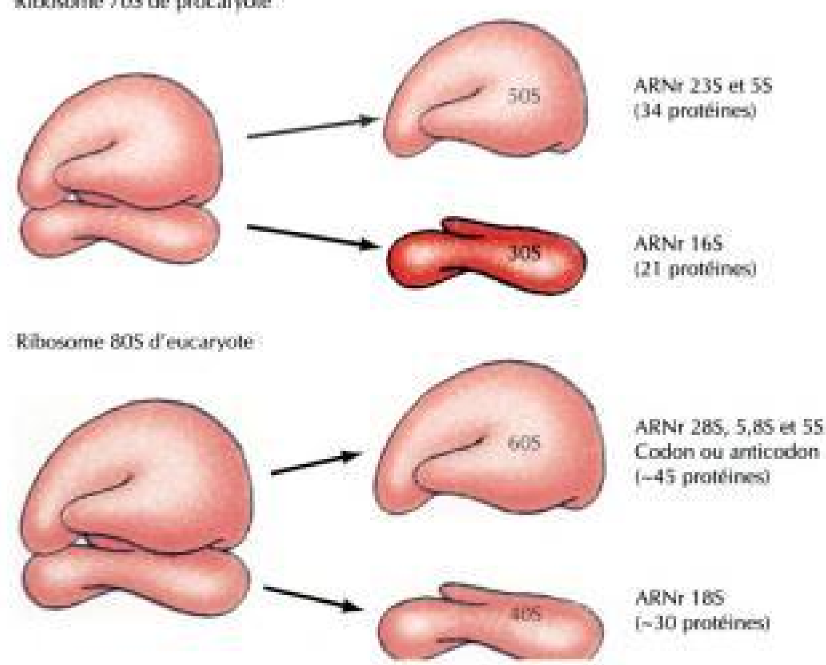


Figure 7.4
Structure du ribosome.
(A) Micrographie électronique d'éléments 50S de ribosomes de *E. coli.* (B) Modèle de la structure ribosomiale. (C) Composants des ribosomes de procaryote et d'eucaryote. Les ribosomes entiers sont désignés respectivement 70S et 80S, d'après leur vitesse de sédimentation au cours d'une ultracentrifugation ; ils comportent un grand élément et un petit élément, composé chacun de protéines ribosomiales et de molécules d'ARNr. (D'après Boublik *et al.*, 1990, *The Ribosome*, p. 115. Aimablement fourni par l'American Society for Microbiology)

sembler *in vitro* fut un moyen unique d'examiner le rôle joué par chacune de ses protéines et chacun de ses ARNr.

Comme les ARNt, les ARNr se plient en une structure secondaire par appariement de bases complémentaires (figure 7.5) ; puis, une fois associés à des protéines, ils se replient encore pour former une structure tridimensionnelle singulière. On a cru que les ARNr ne servaient qu'à soutenir un échafaudage sur lequel les protéines venaient s'assembler, mais depuis la découverte de l'activité catalytique d'autres molécules d'ARN, (par exemple, l'ARNase P et les introns doués d'auto-épissage, présentés au chapitre 6), on a accordé aux ARNr un rôle catalytique ; ceci est vraisemblable puisqu'on a montré que ces ARNr sont indispensables à l'assemblage *in vitro* de ribosomes physiologiquement compétents, alors que l'omission de plusieurs protéines ribosomiales ne faisait que décroître l'activité du ribosome.

La preuve directe de l'activité catalytique des ARNr fut fournie par les travaux de Harry Noller et ses collègues en 1992 ; ils montrèrent que le grand

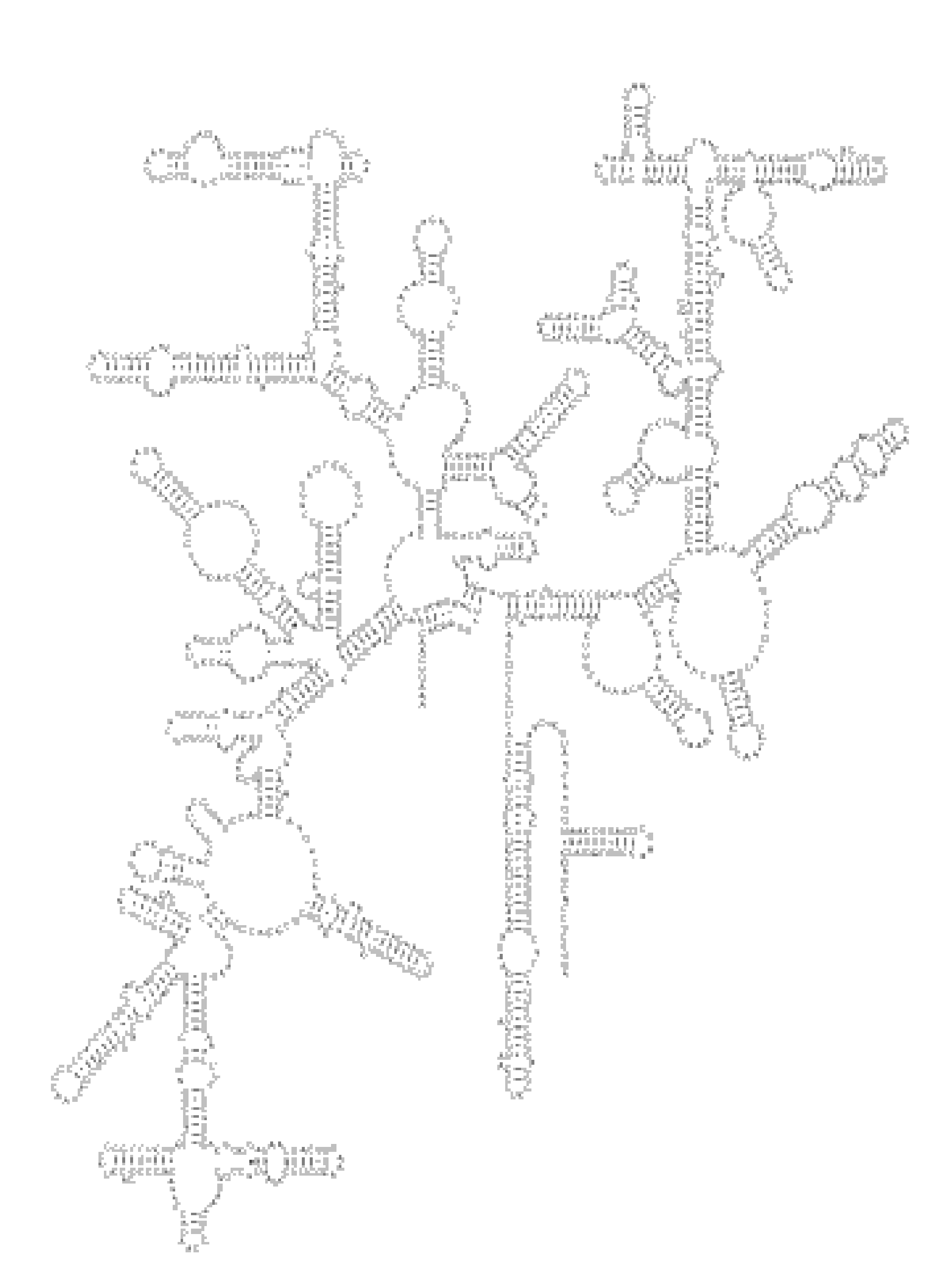


Figure 7.5
Structure d'un ARNr 16S.
L'appariement des bases complémentaires maintient une structure secondaire unique. (D'après Stern *et al.*, 1989, *Science* **244** :783)

élément ribosomial peut catalyser la formation de liaisons peptidiques (réaction de la peptidyl transférase), même quand on a éliminé environ 95 % des protéines ribosomiales par les méthodes classiques d'extraction de protéine. Par contre, un traitement par l'ARNase empêchait complètement la formation de liaisons peptidiques, argument en faveur de l'hypothèse selon laquelle la formation des liaisons peptidiques est due à l'activité catalytique d'un ARN. D'autres études montrèrent que l'ARNr 23S entre en interaction avec le bout 3' CCA de l'ARNt et prend directement part à la réaction de transfert par la peptidyl transférase. On pense maintenant que les protéines ribosomiales ne sont pas les catalyseurs vrais du ribosome, mais qu'elles servent au reploiement correct de l'ARNr et, en mettant les ARNt en bonne place, améliorent le fonctionnement du ribosome.

La participation directe de l'ARNr à la réaction de la peptidyl transférase a d'importantes implications dans la théorie évolutionniste. On admet que les ARN furent les premières molécules douées d'auto-réplication (voir chapitre 1) ; cette hypothèse est solidement confirmée par le fait que des ribozymes, comme l'ARNase P et les introns d'auto-épissage, catalysent des réactions portant sur des substrats de nature ARN. Le rôle des ARNr dans la formation de la liaison peptidique étend le pouvoir catalytique des ARN au delà de l'autoréplication, jusqu'à une intervention directe dans la synthèse des protéines. D'autres études montrent que le ribozyme à ARNr de *Tetrahymena* catalyse l'attachement d'acides aminés à l'ARN, suggérant que les premières aminoacyl-ARNt synthétases étaient constituées uniquement d'ARN. Le pouvoir qu'ont les molécules d'ARN de catalyser les réactions propres à la synthèse protéique et à leur autoréplication serait une balise primordiale pour saisir l'évolution des premières cellules.

Infrastructure des ARNm et démarrage de la traduction

Si les mécanismes de synthèse protéique sont semblables dans la cellule de procaryote et dans la cellule d'eucaryote, on y distingue aussi des différences, notamment dans les signaux qui déterminent le site de la matrice d'ARNm où démarre la synthèse de la chaîne polypeptidique (figure 7.6). Ce n'est pas le bout 5' de l'ARNm qui sert de site d'amorçage à la traduction, mais certains endroits particuliers de sa séquence ; en effet, les tronçons 5'-terminaux des ARNm tant procaryotiques que eucaryotiques sont des séquences non codantes, appelées **régions 5' non traduites**. Un ARNm d'eucaryote ne code généralement qu'une seule chaîne polypeptidique, alors

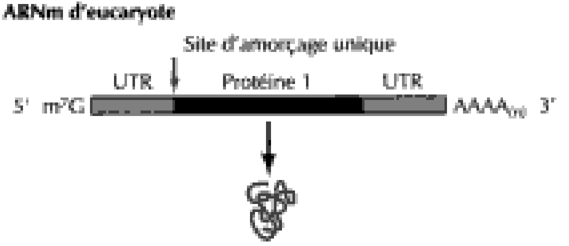


Figure 7.6
ARNm de procaryote et d'eucaryote. Les deux sortes comportent une région non traduite (UTR) à leur bout 5' et à leur bout 3'. Les ARNm d'eucaryote comportent en plus une coiffe 5' de 7-méthylguanosine et une queue 3' poly-A. Beaucoup d'ARNm de procaryote sont polycistroniques, c'est-à-dire qu'ils codent plusieurs protéines, chacun traduite à partir d'un site d'amorçage particulier. Les ARNm d'eucaryote sont en général monocistroniques et ne codent qu'une seule protéine.

EXPÉRIENCE CLÉ



Rôle catalytique de l'ARN ribosomal

Résistance exceptionnelle d'une peptidyl transférase aux méthodes d'extraction des protéines

Harry F. Noller, Vernita Hoffarth, and Ludwika Zimniak
University of California at Santa Cruz
Science, Volume 256, 1992, pages 1416–1419

Contexte

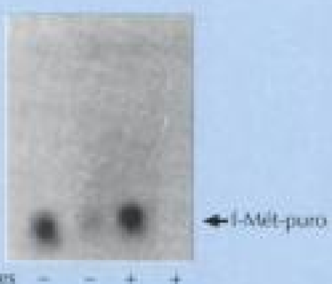
Le rôle du ribosome dans la synthèse des protéines fut découvert dans les années '60 ; le ribosome se présentait à cette époque comme une particule faite de protéines et d'ARN et on avait réussi à le reconstituer sous forme native à partir de ses composants purs. On considérait à cette époque que la liaison peptidique se formait (réaction de la peptidyltransférase) sous l'action des protéines ribosomiales, laissant aux ARNr un rôle de soutien de la structure ribosomiale. Néanmoins, déjà dans les années '70, certains résultats se multiplièrent qui plaidaient pour un rôle plus direct des ARNt dans la synthèse des protéines ; on pouvait par exemple éliminer du ribosome beaucoup de protéines sans pour autant invalider la synthèse protéique ; d'autre part, on s'aperçut que la séquence de certaines parties de l'ARNr s'étaient très bien conservées au cours de l'évolution, suggérant un rôle clé dans le fonctionnement de ces morceaux de molécules d'ARNr.

Au début des années '80, les travaux de Tom Cech sur le ribozyme de *Tetrahymena* et de Sidney Altman sur l'ARNase P démontrèrent l'activité catalytique des molécules d'ARN. Ces découvertes appuyaient l'hypothèse selon laquelle l'ARNr est directement en jeu comme catalyseur de la formation de la liaison peptidique. Une preuve irréfutable en fut fournie par les résultats publiés dans cet article de 1992 par Harry Noller et ses collaborateurs.

Preuve expérimentale

Pour chercher l'activité catalytique des ARNr, Noller et son groupe mirent au point un modèle simplifié de la réaction catalysée par la peptidyltransférase ; cela consistait à mesurer le degré de transfert de formylméthionine marquée d'un fragment d'ARNt au groupe aminé de la puromycine, un antibiotique qui ressemble à un aminoacyl-ARNt et forme une liaison peptidique avec une chaîne peptidique naissante. L'avantage de ce modèle de réaction de la peptidyltransférase est qu'il fonctionne avec seulement l'élément ribosomial 50S, c'est-à-dire en l'absence du petit élément ribosomial, d'autres facteurs protéiques et d'ARNm.

Les chercheurs tentèrent ensuite de trouver quel était le rôle de l'ARNt en mesurant l'activité de peptidyltransférase de l'élément 50S dont on avait éliminé les protéines par les méthodes d'extraction classiques. Un trait important de cette expérience était le fait d'utiliser des ribosomes de la bactérie *Thermus aquaticus* ; comme cet organisme vit à température élevée, on pensait que la structure de son ARNr était plus stable que celle de l'ARNr de *E. coli*. Le résultat marquant fut que l'activité peptidyltransférase des ribosomes de *Th. aquaticus* résistait tout à fait à une méthode vigoureuse d'extraction, comprenant un traitement par des détergents, puis par des protéases, suivis d'une extraction phénolique (voir figure) ; le plus convainquant était le fait qu'on retrouvait toute l'activité peptidyltransférase après plusieurs extractions qui éliminaient 95 % des protéines du ribosome. Par contre, l'activité de peptidyltransférase des ribosomes intacts ou extraits



Pour mesurer la réaction de la peptidyltransférase, on a dosé la formation de *N*-formylméthionyl-puromycine (f-mét-puro) par électrophorèse et autoradiographie. On a employé des ribosomes de *Thermus aquaticus*, soumis soit à une extraction des protéines soit à l'action de l'ARNase.

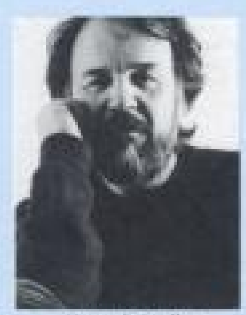
que beaucoup d'ARNm de procaryote codent plusieurs polypeptides synthétisés indépendamment à partir d'un site d'amorçage propre. L'opéron *lac* de *E. coli*, par exemple, comporte trois gènes qui seront traduits d'un seul ARNm (voir figure 6.8) ; ces messagers qui codent plusieurs polypeptides sont qualifiés de **polycistroniques**, ceux qui ne codent qu'un polypeptide de **monocistroniques**. Les ARNm de procaryotes et d'eucaryotes finissent par une séquence non codante, la **région 3' non traduite**.

Rôle catalytique de l'ARN ribosomal (suite)

disparaissait après un bref traitement par l'ARNase. Ces résultats ne pouvaient exclure un rôle éventuel des protéines restantes, mais plaidaient nettement pour une participation directe de l'ARNr 23S dans la réaction peptidyltransférasique.

Portée de la découverte

Les résultats des expériences de Noller, en faveur du rôle catalytique de l'ARNr dans la formation de la liaison peptidique, bouleversa notre conception du fonctionnement du ribosome mais élargit aussi notablement les capacités catalytiques déjà connues des molécules d'ARN. En outre, ces découvertes étaient complétées au même moment par une publication du laboratoire de Tom Cech (Piccirilli *et al.*, *Science* **256** :1420-1424, 1992) qui confirmait le pouvoir qu'a l'ARN de catalyser des réactions mettant en jeu des acides aminés en montrant que l'ARN servait d'aminoacyl-ARNt synthétase. Ces recherches complémentaires apportaient de nouveaux arguments en faveur de l'hypothèse selon laquelle à une certaine période précoce de l'évolution régnait un monde de l'ARN peuplé de molécules d'ARN capables d'autoréplication. On avait élaboré cette hypothèse sur la capacité qu'ont les molécules d'ARN de catalyser des réactions impliquées dans leur propre réplication ; prouver que l'ARN catalysait aussi des réactions en jeu dans la synthèse protéique fournit un rapprochement indubitable entre le monde de l'ARN et le flux d'information génétique observé dans les cellules contemporaines, où l'ARNr a gardé son rôle dans la réaction clé de synthèse de la liaison peptidique.



Harry F. Noller

Dans les deux classes d'organismes, la traduction débute toujours par l'insertion d'un résidu de méthionine, codé en général par AUG ; on connaît d'autres codons d'amorçage, par exemple GUG, utilisé parfois par les bactéries ; quand ils codent le début d'une chaîne, ces codons dictent l'incorporation d'une méthionine et pas de l'acide aminé qu'ils codent d'habitude (GUG code normalement la valine). Chez la plupart des bactéries, la synthèse des protéines débute par un résidu méthionine modifié en *N*-formylméthionine, tandis que chez les eucaryotes, c'est par une méthionine non modifiée que commence la chaîne (sauf dans la mitochondrie et le chloroplaste, où les ribosomes ressemblent à ceux des bactéries).

Le codons qui servent de signal d'amorçage diffèrent chez procaryotes et eucaryotes, en accord avec le fonctionnement particulier des ARNm mono- et poly-cistroniques (figure 7.7). Le codon d'amorçage d'un ARNm bactérien est précédé d'une séquence singulière (appelée **séquence de Shine-Delgarno**, du nom de son découvreur) qui aligne l'ARNm sur le ribosome grâce

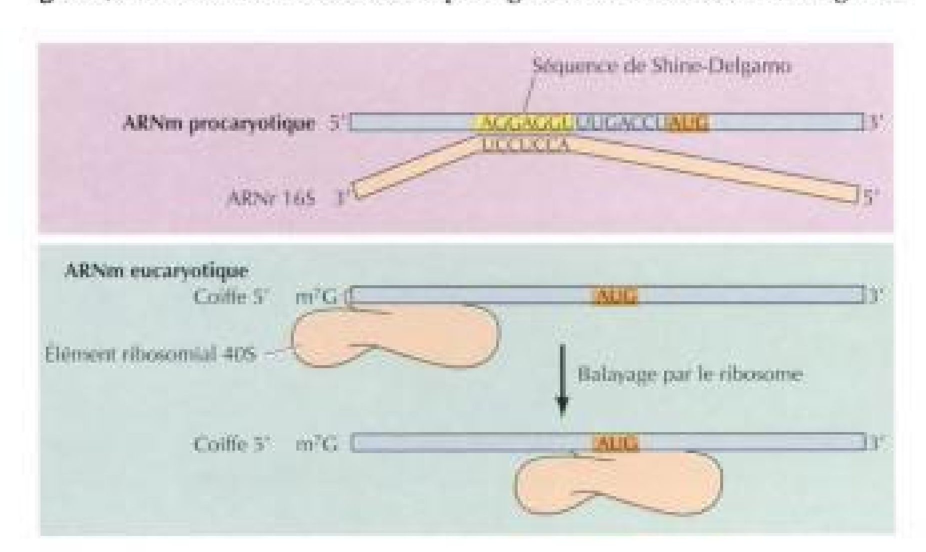


Figure 7.7
Signaux d'amorçage de traduction. Dans les ARNm de procaryote, les sites d'amorçage de traduction sont marqués par une séquence de Shine-Delgarno qui précède le codon d'amorçage AUG. L'appariement de bases entre cette séquence et une séquence complémentaire voisine du bout 3' de l'ARNr 16S aligne l'ARNm sur le ribosome. Par contre, les ARNm d'eucaryote se fixent à l'élément 40S du ribosome par la coiffe 7-méthylguanosine de leur bout 3'. Le ribosome court alors le long de l'ARNm jusqu'à ce qu'il rencontre un codon d'amorçage AUG.

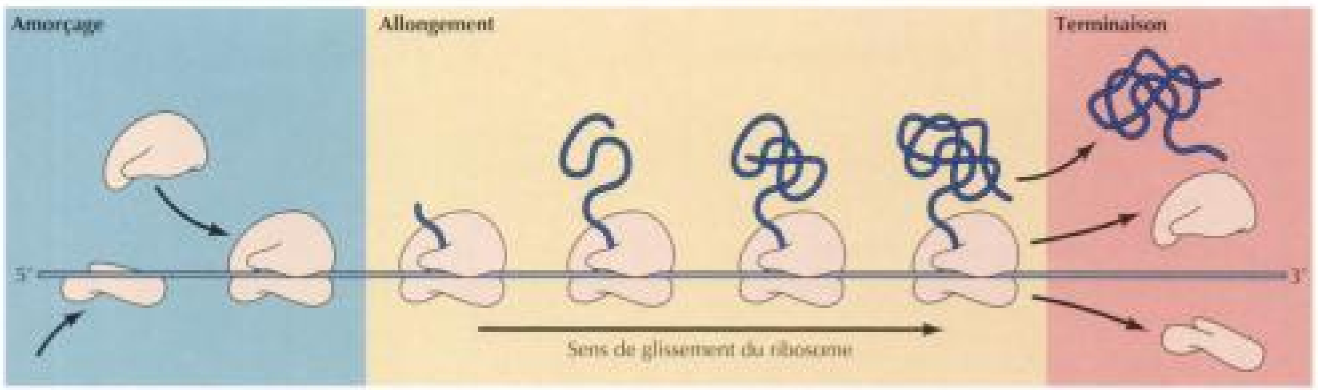


Figure 7.8
Schéma du mécanisme de traduction.

à son appariement avec une séquence complémentaire du bout 3′ de l'ARNr 16S. Cette interaction par appariement de bases rend les ribosomes bactériens capables d'amorcer la traduction non seulement au bout 5′ d'un ARNm, mais aussi aux sites d'amorçage internes d'un ARNm polycistronique. Par contre, chez les eucaryotes, les ribosomes reconnaissent les ARNm grâce à la coiffe 7-méthylguanosine de leur bout 5′ (voir figure 6.39). Le ribosome quitte alors la coiffe pour glisser en aval en s'arrêtant seulement dès qu'il rencontre un codon d'amorçage AUG ; les séquences voisines de AUG influencent l'efficacité de l'amorçage, de sorte que le premier AUG rencontré est souvent sauté et que la traduction ne démarre qu'à un codon d'amorçage situé en aval. Notons qu'il n'existe, chez les eucaryotes, aucune séquence équivalente à la séquence de Shine-Delgarno des ARNm de procaryotes. La traduction d'un ARNm d'eucaryote ne démarre jamais que sur un site trouvé par balayage de l'ARNm à partir de son bout 5′, en accord avec son rôle de message monocistronique traduit en une chaîne polypeptidique unique.

Processus de la traduction

On peut voir que la traduction se déroule en trois étapes, à savoir, l'amorçage, l'allongement et la terminaison (figure 7.8). Tant chez les procaryotes que chez les eucaryotes, l'amorçage débute par la fixation d'un méthionyl-ARNt amorceur particulier et d'un ARNm à un petit élément de ribosome ; le grand élément de ribosome rejoint ensuite le complexe, en formant un ribosome fonctionnel sur lequel la chaîne polypeptidique va s'allonger. Diverses étapes de la traduction exigent aussi plusieurs protéines non ribosomiales spécifiques (tableau 7.1).

Tableau 7.1 Facteurs de traduction

Rôle	Facteurs de traduction: Procaryotiques	Eucaryotiques
Amorçage	IF-1, IF-2, IF-3	eIF-1, eIF-2, eIF-2B, eIF3, eIF-4A, eIF-4B, eIF-4C, eIF-4F, eIF-5, eIF-6
Allongement	EF-Tu, EF-Ts, EF-G	eEF-1α, eEF-1βγ, eEF-2
Achèvement	RF-1, RF-2	eRF

MÉDECINE MOLÉCULAIRE



Antibiotiques et synthèse protéique

La maladie

Les bactéries sont responsables de toute une série de maladies infectieuses potentiellement létales, entre autres la tuberculose, les pneumonies à bactéries, la méningite du jeune enfant, l'infection des blessures et des brûlures, la syphilis et la blennorragie. Avant les années '40, le médecin restait impuissant devant ces infections bactériennes, puis le premier antibiotique fut mis à la disposition des cliniciens. Ceux-ci pouvaient alors guérir des infections jadis incurables ; il est certain qu'on doit attribuer en partie l'accroissement de la longévité humaine aux traitements par les antibiotiques. On emploie à présent plus d'une centaine d'antibiotiques différents pour traiter les infections bactériennes.

Bases moléculaire et cellulaire

Pour agir sur une maladie, tout antibiotique doit tuer les bactéries ou ralentir leur prolifération sans être toxique pour l'Homme. Les antibiotiques admis en clinique s'attaquent pour la plupart à des cibles présentes chez les bactéries mais pas chez l'Homme ; la pénicilline, par exemple, inhibe la synthèse de la paroi bactérienne (voir chapitre 12). Cependant, d'autres antibiotiques courants inhibent diverses étapes de la synthèse protéique (voir tableau) ; certains de ces antibiotiques, dont la streptomycine, la tétracycline, le chloramphénicol et l'érythromycine, s'attaquent spécifiquement aux ribosomes des procaryotes et sont des agents efficaces pour soigner les infections bactériennes. D'autres antibiotiques inhibiteurs de la synthèse protéique s'attaquent à la fois aux procaryotes et aux eucaryotes (par exemple la puromycine) ou seulement aux eucaryotes (par exemple le cycloheximide). Si on ne peut évidemment pas les employer en médecine, ils sont d'intéressants réactifs pour étudier la synthèse protéique tant chez les procaryotes que chez les eucaryotes.

Antibiotiques inhibant la synthèse des protéines

Antibiotique	Cellules cible	Effet
Streptomycine	Procaryote	Inhibe l'amorçage et introduit des erreurs de lecture
Tétracycline	Procaryote	Inhibe la fixation des aminoacyl-ARNt
Chloramphénicol	Procaryote	Inhibe la peptidyltransférase
Erythromycine	Procaryote	Inhibe la translocation dans le ribosome
Puromycine	Pro- et eu-caryote	Arrête prématurément la traduction
Cycloheximide	Eucaryote	Inhibe la peptidyltransférase

Prévention et traitement

En permettant de guérir des infections bactériennes jadis mortelles, l'usage des antibiotiques a révolutionné la médecine, mais, malheureusement, les mutations ont fait apparaître des souches bactériennes résistantes aux antibiotiques. Comme beaucoup de souches bactériennes sont devenues résistantes à au moins un antibiotique, le médecin doit maintenant tester la résistance des bactéries incriminées envers un éventail d'antibiotiques pour en trouver un qui a gardé son efficacité ; en outre, la dispersion des souches résistantes a obligé les cliniciens à abandonner certains antibiotiques. Ce qui est plus grave, il s'est formé des souches devenues résistantes à de nombreux antibiotiques ; certaines souches de bactéries, colonisant les hôpitaux, ne sont même plus sensibles qu'à un ou quelques-uns des antibiotiques commerciaux. L'émergence de ces souches plurirésistantes agite le spectre d'infections irrémédiables dues à leur prolifération, un scénario qui nous reporterait à l'ère des infections bactériennes laissées à elles-mêmes. La thérapeutique moderne doit donc à la fois lutter contre la propagation des souches résistantes, en rationnalisant l'usage actuel des antibiotiques, et inventer de nouveaux antibiotiques.

Chez la bactérie, le premier pas de la traduction est l'attachement de trois **facteurs d'amorçage** (IF-1, IF-2 et IF-3) à l'élément ribosomial 30S (figure 7.9) ; ceux-ci sont rejoints par l'ARNm et le *N*-formylméthionyl-ARNt amorceur, reconnu spécifiquement par IF-2 (chargé de GTP). IF-3 quitte alors le complexe, en faisant place, dans le complexe, à l'élément ribosomial 50S. Cette association déclenche l'hydrolyse du GTP fixé à IF-2, ce qui enclenche le départ de IF-1 et IF-2 (alors chargé de GDP). Il s'est ainsi formé un complexe d'amorçage 70S (avec l'ARNt amorceur et l'ARNm attachés au ribosome) prêt à former des liaisons peptidiques qui allongeront la chaîne à la deuxième étape de la traduction.

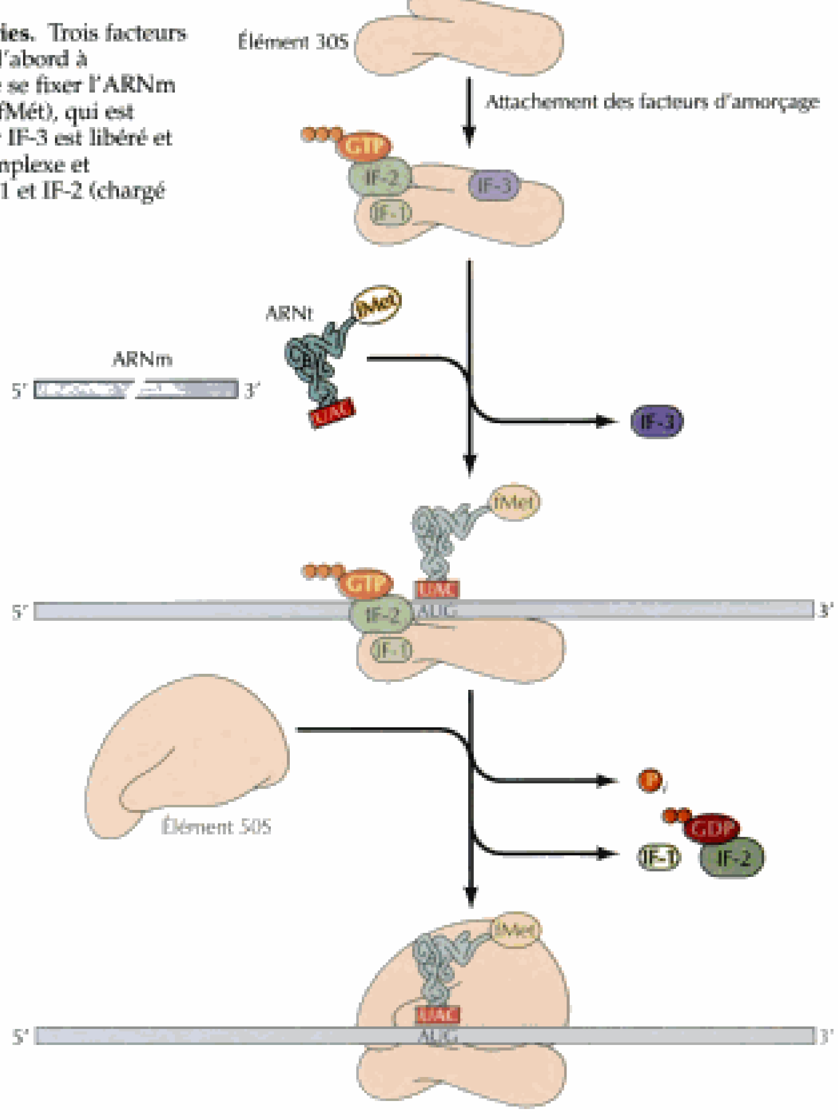


Figure 7.9
Amorçage de la traduction chez les bactéries. Trois facteurs d'amorçage (IF-1, IF-2 et IF-3) s'attachent d'abord à l'élément ribosomial 30S ; viennent ensuite se fixer l'ARNm et le *N*-formylméthionyl-ARNt amorceur (fMét), qui est reconnu par IF-2 chargé de GTP. Le facteur IF-3 est libéré et l'élément 50S du ribosome s'attache au complexe et enclenche l'hydrolyse du GTP lié ; puis IF-1 et IF-2 (chargé de GDP) quittent le complexe.

L'amorçage est plus compliqué chez les eucaryotes et met en jeu dix protéines au moins (chacune est un multimère), désignées eIF (*pour eucaryotic initiation factor* ; voir tableau 7.1). Les facteurs eIF-1A et eIF-3 s'attachent à l'élément ribosomial 40S et eIF-2 (chargé de GTP) s'associe au méthionyl-ARNt pour rejoindre l'élément 40S (figure 7.10). La coiffe 5′ de l'ARNm est reconnue par eIF-4E (le protomère de eIF-4F se fixant à la coiffe), qui, associé à eIF-4A et à eIF-4B, attire l'ARNm vers le ribosome. L'élément ribosomial 40S chargé à présent du méthiony-ARNt et de facteurs eIF glisse sur l'ARNm jusqu'à ce qu'il y rencontre un codon d'amorçage AUG ; cela fait, eIF-5 enclenche l'hydrolyse du GTP fixé à eIF-2 ; ceci libère les facteurs d'amorçage (y compris eIF-2 chargé de GDP), puis un élément 60S vient se fixer à l'élément 40S pour former le complexe d'amorçage 80S de la cellule eucaryotique.

Une fois le complexe d'amorçage assemblé, la traduction se poursuit par l'allongement de la chaîne polypeptidique. Le processus d'allongement est très semblable chez les procaryotes et les eucaryotes (figure 7.11). Le ribo-

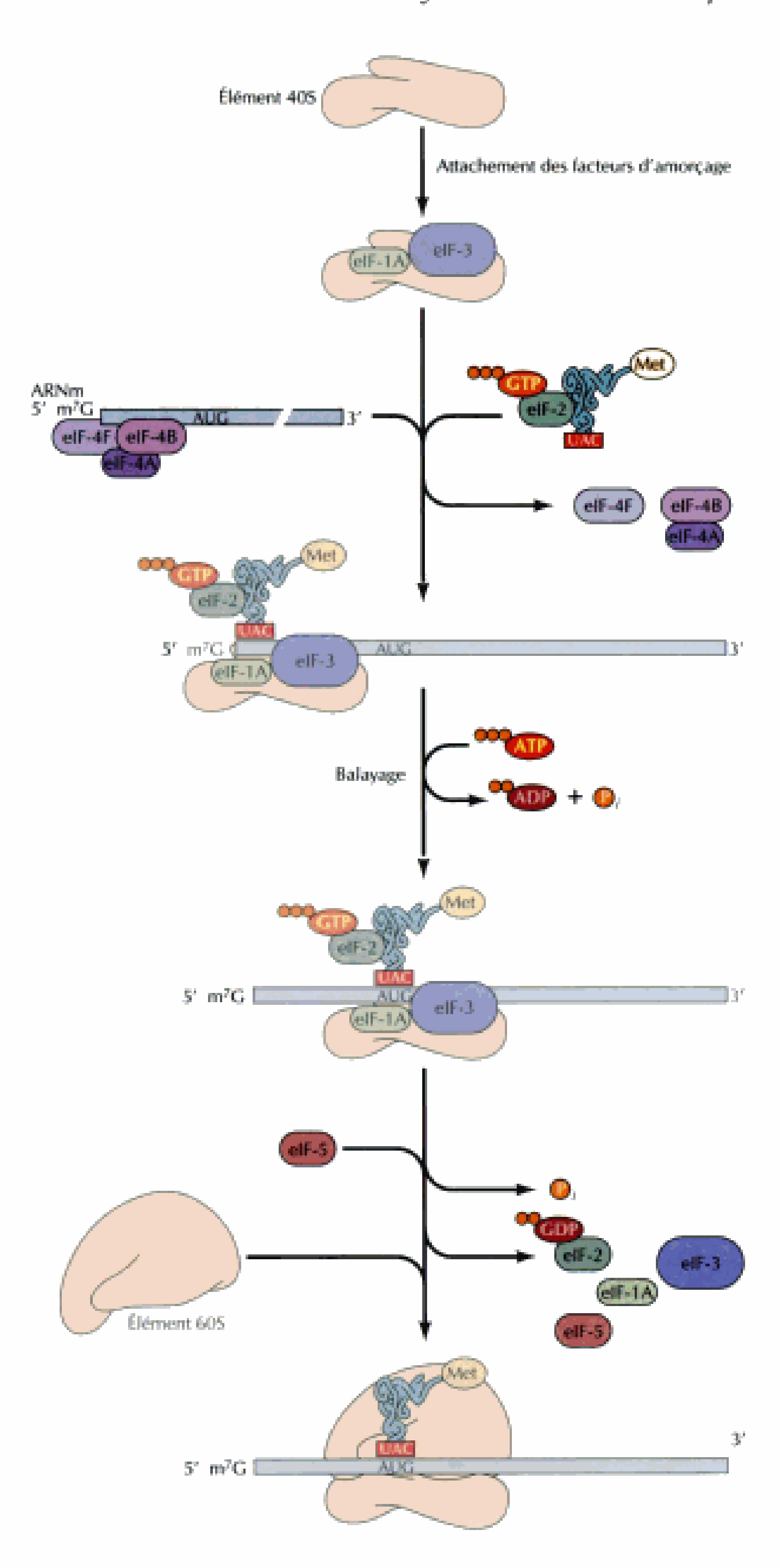


Figure 7.10
Amorçage de la traduction chez les eucaryotes. Les facteurs d'amorçage eIF-3 et eIF-1A se fixent à l'élément 40S du ribosome. Le méthionyl-ARNt amorceur est convoyé au ribosome par eIF-2 chargé de GTP et l'ARNm y est poussé par eIF-4F (il s'attache à sa coiffe 5'), eIF-4A et eIF-4B. Le ribosome glisse alors sur l'ARNm jusqu'à ce qu'il y rencontre un premier codon AUG ; cette course exigeant de l'énergie, elle se fait aux dépens d'ATP. Une fois le complexe arrivé au codon d'amorçage, eIF-5 enclenche l'hydrolyse du GTP lié à eIF-2, qui va, chargé de GDP, quitter le complexe, comme le font les autres facteurs d'amorçage. L'élément 60S du ribosome vient enfin rejoindre l'élément 40S.

some comporte trois sites de liaison pour les ARNt, le site P (peptidyl), le site A (aminoacyl) et le site E (*exit*, en anglais). Le méthionyl-ARNt amorceur est fixé au site P ; l'allongement démarre par la fixation du prochain aminoacyl-ARNt au site A, grâce à son appariement avec le second codon de l'ARNm. L'aminoacyl-ARNt est escorté vers le ribosome par un **facteur d'allongement** (EF-Tu chez les procaryotes, eEF-1α chez les eucaryotes) complexé à un GTP. Ce GTP est hydrolysé au moment où l'aminoacyl-ARNt correct entre au site A du ribosome, avec départ du facteur d'allongement chargé de GDP. L'étape d'hydrolyse de GTP qui conditionne la sortie de EF-Tu ou eEF-1α du ribosome est l'étape limitante de l'allongement : c'est le moment où un aminoacyl-ARNt inadéquat, mal fixé à l'ARNm, peut quitter le ribosome, au lieu d'être incorporé dans la chaîne ; la dépense d'un GTP, une molécule riche en énergie, contribue à ce moment à la précision de la synthèse de la protéine, car elle donne au ribosome le temps de vérifier la concordance de l'anticodon avec le codon avant de former la liaison peptidique.

Une fois que EF-Tu (ou eEF-1α) a quitté le ribosome, une liaison peptidique peut se former entre le méthionyl-ARNt amorceur du site P et l'autre aminoacylARNt du site A ; cette réaction est effectuée par le grand élément du ribosome, dont l'ARNr joue, comme on l'a déjà mentionné, un rôle prépondérant. Il en résulte un transfert de résidu méthionyle à l'aminoacyl-ARNt occupant le site A du ribosome, qui forme un peptidyl-ARNt et laisse au site P l'ARNt amorceur déchargé. Dans le processus d'allongement vient ensuite la translocation, effectuée aux dépens d'une autre molécule de GTP, par un nouveau facteur d'allongement (EF-G chez les procaryotes et eEF-2 chez les eucaryotes). Lors de la translocation, le ribosome glisse en avant de trois nucléotides sur l'ARNm, en alignant le codon suivant en face d'un site A vide ; cette étape fait passer le peptidyl-ARNt du site A au site P et l'ARNt déchargé du site P au site E. On a à ce moment un ribosome dont le site P est occupé par le peptidyl-ARNt et dont le site A est vide. Dès qu'un nouvel aminoacyl-ARNt vient s'attacher au site A, l'ARNt déchargé est chassé du site E, ce qui laisse au ribosome le champ libre pour insérer le résidu d'acide aminé suivant dans la chaîne polypeptidique naissante.

Au cours de cet allongement de chaîne, le GDP fixé au facteur EF-Tu (ou eEF-1α) libéré du ribosome doit être reconverti en GTP (figure 7.12) ; ceci exige l'intervention d'un autre facteur d'allongement, EF-Ts (eEF-1βγ chez les eucaryotes) qui s'attache au complexe EF-Tu/GDP et catalyse l'échange de son GDP contre un GTP. Ainsi se reconstitue EF-Tu-GTP, prêt à accompagner un nouvel aminoacyl-ARNt au site A du ribosome, dans un nouveau cycle d'allongement de la chaîne. La régulation de EF-Tu par chargement d'un GTP suivi de son hydrolyse illustre un processus fréquent de régulation de l'activité de certaines protéines. On verra bientôt que de semblables

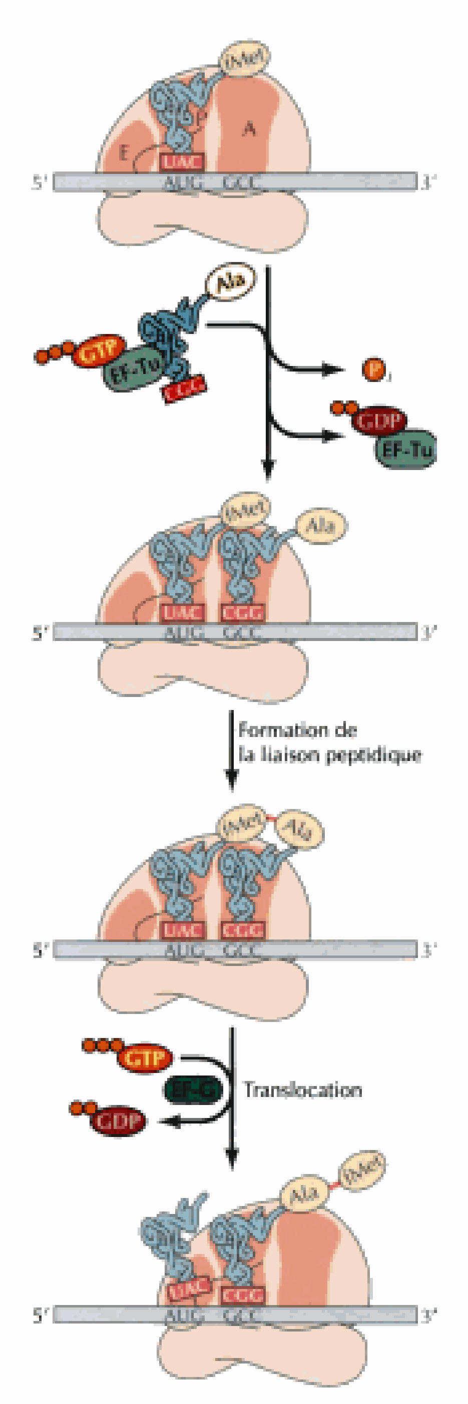


Figure 7.11
Étape d'allongement de la chaîne naissante. Le ribosome porte trois sites d'attachement pour les ARNt, désignés P (peptidyle), A (aminoacyle) et E (sortie). Le *N*-formylméthionyl-ARNt amorceur quitte le site A pour venir occuper le site P ; le second aminoacyl-ARNt (ici un alanyl-ARNt) est attiré au site A par EF-Tu (chargé de GTP). Après hydrolyse de ce GTP, EF-Tu, chargé de GDP, quitte le ribosome en laissant l'aminoacyl-ARNT inséré au site A. Alors se forme la liaison peptidique, par transfert du résidu méthionyle à l'aminoacyl-ARNt du site A. Le ribosome se déplace alors de trois nucléotides le long de l'ARNm ; ce déplacement fait passer le peptidyl (Mét-Ala)-ARNt au site P et l'ARNt déchargé au site E, en laissant un site A inoccupé pour l'arrivée du nouvel acide aminé. La translocation est due à EF-G, qu'accompagne une hydrolyse de GTP. Le processus, illustré ici pour les procaryotes, s'applique assez bien aux eucaryotes (le tableau 7.1 énonce les facteurs d'allongement propres aux eucaryotes).

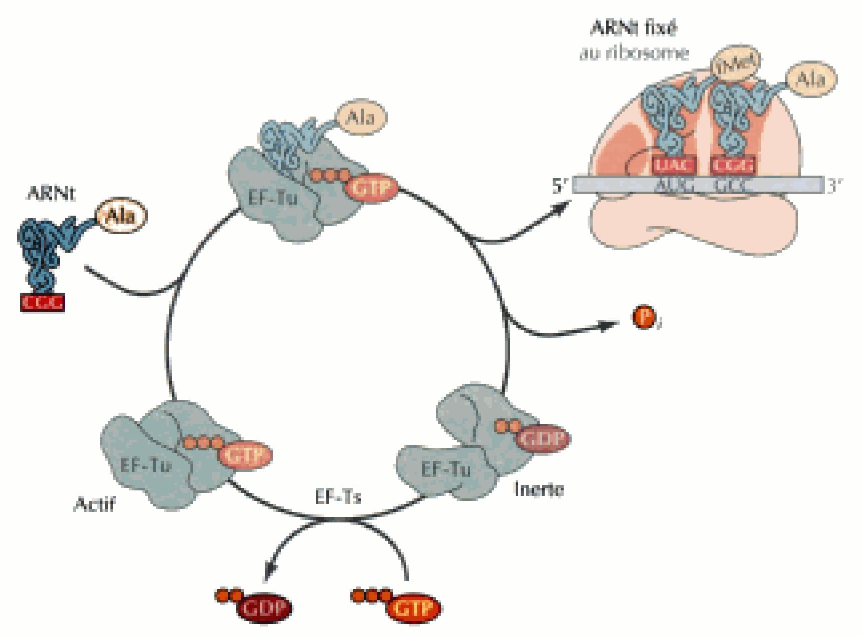


Figure 7.12
Régénération de EF-Tu/GTP Chargé de son GTP, EF-Tu escorte l'aminoacyl-ARNt jusqu'au ribosome. Au moment de l'insertion de l'aminoacyl-ARNt correct, GTP s'hydrolyse et EF-Tu chargé de GDP quitte le ribosome ; sous cette forme, ce complexe n'est plus capable de s'attacher à un autre ARNt. Pour que la traduction continue, un nouveau complexe EF-Tu/GTP doit se reformer, sous l'action d'un autre facteur, EF-Ts, qui stimule l'échange du GDP contre un GTP.

mécanismes modulent l'activité de tout une série de protéines mises en jeu dans la commande de la prolifération et de la différenciation cellulaires ainsi que dans le transport et la sécrétion des protéines.

L'allongement de la chaîne polypeptidique se poursuit jusqu'à ce qu'un codon stop (UAA, UAG ou UGA) vienne occuper le site A du ribosome. La cellule ne contient pas d'ARNt pourvu d'anticodon complémentaire de ces signaux de terminaison, mais possède des **facteurs de terminaison** qui reconnaissent ces signaux et mettent fin à la synthèse protéique (figure 7.13). Les cellules de procaryote possèdent deux de ces facteurs : RF-1 reconnaît UAA ou UAG et RF-2 reconnaît UAA ou UGA (voir tableau 7.1) ; les cellules d'eucaryote ne possèdent qu'un facteur de terminaison, qui reconnaît les trois codons de terminaison. Ces facteurs vont se fixer à un codon de terminaison occupant le site A et enclencher l'hydrolyse de la liaison unissant l'ARNt à la chaîne polypeptidique occupant le site P, ce qui détache du ribosome la chaîne polypeptidique complétée. L'ARNt est ensuite libéré et les éléments ribosomiaux et l'ARNm se séparent.

Dans la cellule tant procaryotique que eucaryotique, un ARNm est généralement traduit en même temps par plusieurs ribosomes ; dès que l'un d'eux s'est éloigné du site d'amorçage, un autre vient se fixer à l'ARNm et

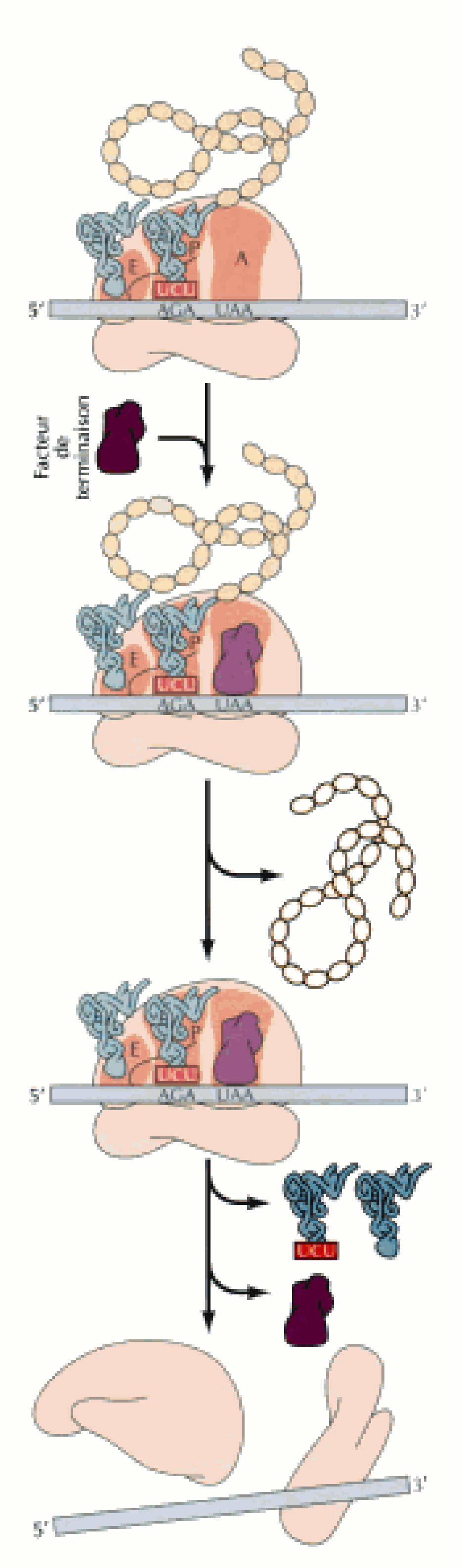
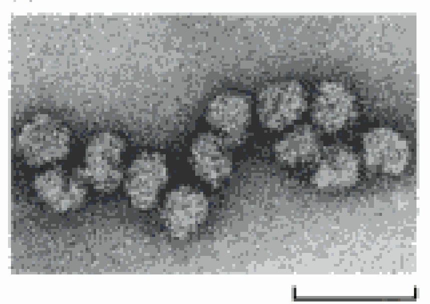


Figure 7.13
Terminaison de la traduction. Un codon de terminaison (par exemple UAA) n'est pas reconnu par un ARNt, mais par un facteur de terminaison ; s'ensuit la libération de la chaîne polypeptidique, puis les ARNt et ARNm quittent le ribosome.

(A)



(B)

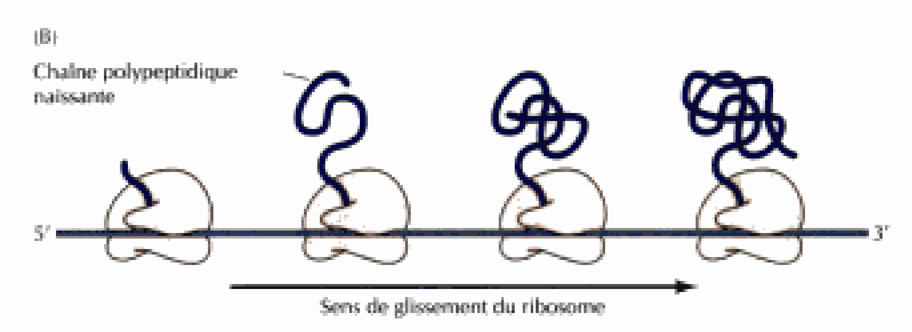


Figure 7.14
Polysomes. Un ARNm est traduit par une série de ribosomes (le polysome). (A) Micrographie électronique d'un polysome d'eucaryote. (B) Schéma du polysome typique. Notez que plus un ribosome s'approche du bout 3' de l'ARNm, plus longue est la chaîne qu'il porte. (A d'après Boulik *et al.*,1990, *The Ribosome*, p. 117. Aimablement transmis par American Society for Microbiology)

débute la synthèse d'une autre chaîne polypeptidique. Tout ARNm est donc traduit d'habitude par une série de ribosomes espacés d'environ 100 à 200 nucléotides (figure 7.14). L'ensemble des ribosomes attachés à une molécule d'ARNm porte le nom de polyribosome, ou **polysome** ; chacun des ribosomes de cet ensemble synthétise sa propre chaîne polypeptidique.

Régulation de la traduction

Si l'expression d'un gène s'ajuste en priorité au niveau de la transcription, la traduction de l'ARNm formé est également susceptible d'ajustement aussi bien chez les procaryotes que chez les eucaryotes. Un des mécanismes par lequel la traduction est modulée est la fixation, à des séquences particulières de l'ARNm, de répresseurs protéiques qui bloquent la traduction. L'exemple le mieux connu de ce mécanisme dans une cellule d'eucaryote est l'ajustement de la synthèse de ferritine, une protéine de mise en réserve du fer par la cellule ; l'ARNm de ferritine est traduit selon le taux de fer : la cellule forme d'autant plus de ferritine que le fer est abondant (figure 7.15). Cet ajustement a lieu par le truchement d'une protéine qui, en cas de carence en fer, se fixe à une séquence (l'élément sensible au taux de fer, ou IRE) du bout 5' de l'ARNm de ferritine, et en empêche la traduction ; en présence de fer, le répresseur n'a plus d'affinité envers la séquence IRE et la traduction de l'ARNm de ferritine reprend.

Il est frappant que la régulation de l'ARNm de ferritine par le taux de fer rappelle l'ajustement de la stabilité de l'ARNm du récepteur de transferrine dont nous avons parlé au chapitre précédent (voir figure 6.50) : la stabilité de cet ARNm de récepteur dépend de la fixation d'une protéine à une séquence IRE de son bout 3' non traduit. C'est la même protéine qui se fixe à l'IRE des ARNm de ferritine et de récepteur de transferrine, mais avec des

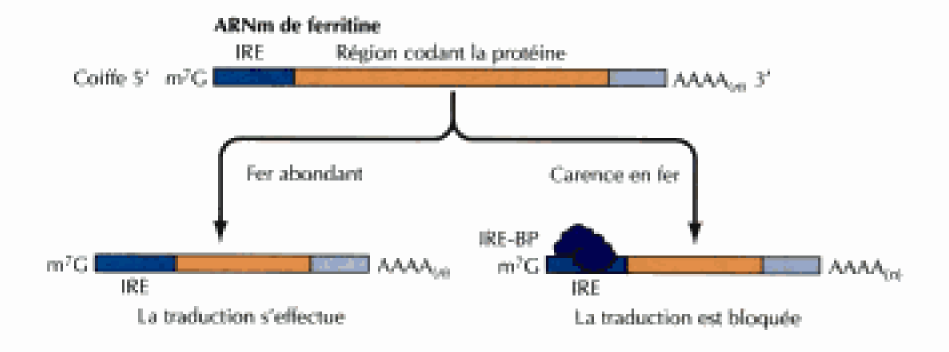


Figure 7.15
Régulation de la production de ferritine. Au voisinage de sa coiffe 5', l'ARNm porte un élément sensible au taux de fer (IRE). Quand le fer est abondant, la traduction de cet ARNm s'effectue normalement, mais pendant une carence en fer, une protéine appelée protéine reconnaissant l'élément sensible au fer, ou IRE-BP, va s'attacher au IRE et bloque la traduction de l'ARNm.

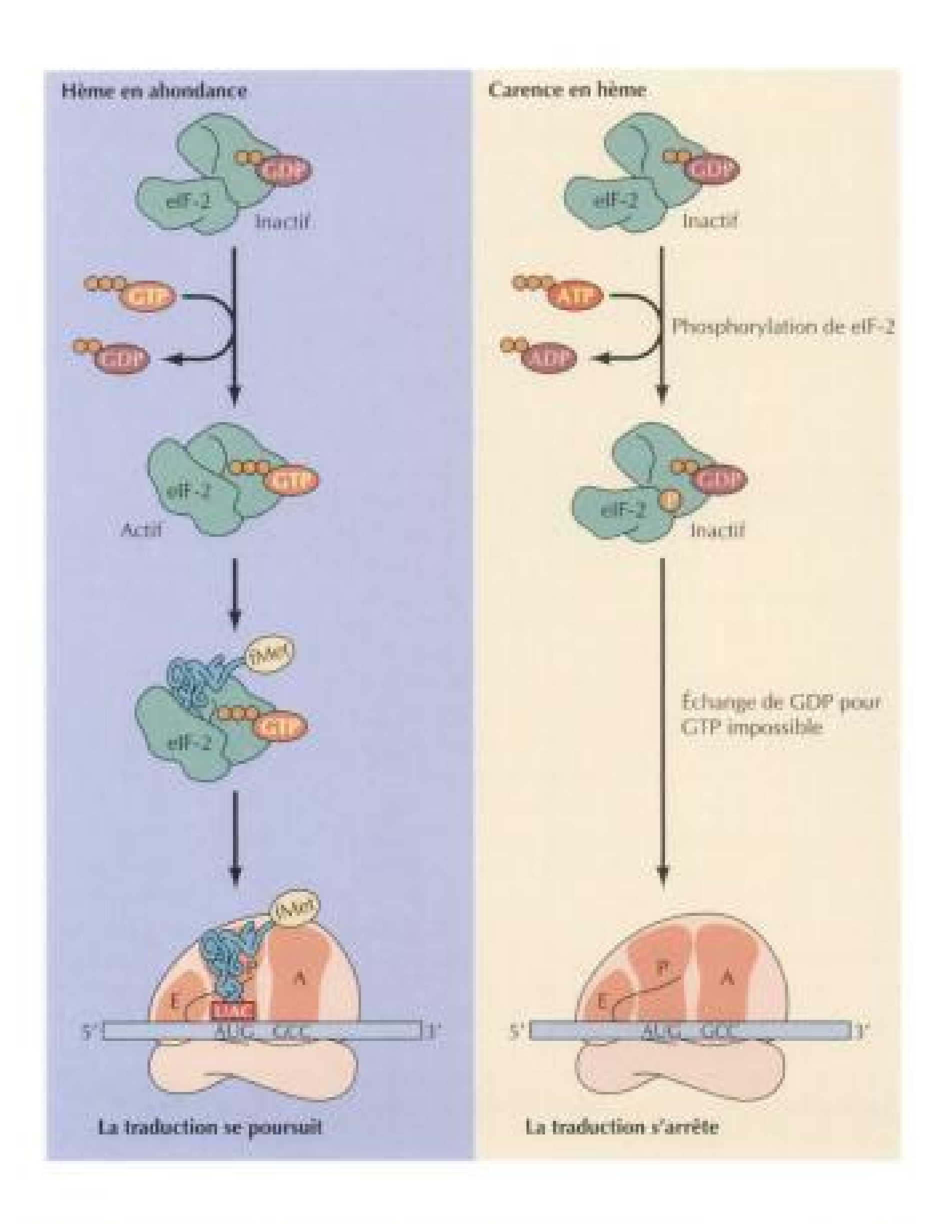
conséquences bien différentes : la protéine fixée à l'IRE de l'ARNm du récepteur de transferrine protège cet ARNm de la destruction, sans rien changer à la vitesse à laquelle il est traduit. La différence vient de ce que ces séquences IRE occupent une place particulière dans chacun de ces ARNm. Pour servir de site répresseur, le IRE doit siéger dans les 70 nucléotides avoisinant la coiffe 5′ de l'ARNm de ferritine, suggérant que la fixation de la protéine à l'IRE empêche la traduction en interférant avec la reconnaissance de la coiffe et l'attachement de l'élément ribosomial 40S. Dans le cas de l'ARNm du récepteur de transferrine, il n'y a pas d'inhibition du processus de traduction ; la fixation de cette protéine à la même séquence IRE placée dans la région 3′ non traduite de l'ARNm protège ce dernier de l'atteinte d'une nucléase destructrice. La fixation d'une même protéine régulatrice en différents endroits de certaines molécules d'ARNm a donc des conséquences différentes sur l'expression des gènes : dans un cas, elle inhibe la traduction, dans l'autre, en stabilisant l'ARNm, elle accroît la synthèse de protéine.

Dans les cellules d'eucaryotes, la traduction est ajustée encore par un autre mécanisme, qui consiste en un effet global sur la capacité de traduire, et ne touche pas tel ARNm plutôt qu'un autre : ceci a lieu par modulation de l'activité des facteurs d'amorçage, entre autres eIF-2. Comme on l'a vu, eIF-2 (chargé de GTP) s'attache au méthionyl-ARNt amorceur et l'attire sur le ribosome ; une fois qu'il a quitté le ribosome, eIF-2, chargé de GDP après hydrolyse de son GTP, devient un complexe inerte. En vue du prochain cycle d'amorçage, il doit être réactivé par échange de son GDP contre du GTP ; ceci se passe grâce à un autre facteur, eIF-2B. L'activité de eIF-2 est donc commandée par fixation et hydrolyse du groupe GTP, comme c'est le cas pour la modulation de EF-Tu (voir figure 7.12), mais celle de eIF-2 est un nœud de modulation primordial pour de nombreuses cellules d'eucaryote. Le facteur eIF-2 en particulier subit l'action de certaines protéines kinases régulatrices ; en bloquant l'échange de GDP contre du GTP, la phosphorylation de eIF-2 empêche l'amorçage de la traduction. Un type de cellule où ce phénomène se produit est le réticulocyte, chargé de synthétiser l'hémoglobine (figure 7.16) ; la traduction de l'ARNm de globine dépend de la disponibilité de l'hème ; l'ARNm n'est traduit que si la cellule dispose d'assez d'hème pour assembler des molécules d'hémoglobine fonctionnelles ; en l'absence d'hème, la cellule synthétise une protéine kinase qui phosphoryle eIF-2 et, partant, bloque la traduction de l'ARNm de globine. On a trouvé semblable mécanisme de régulation de la traduction dans d'autres types cellulaires, notamment dans des cellules infectées par un virus, quand la synthèse des protéines virales est inhibée par l'interféron.

D'autres recherches sur les protéines régulatrices de la traduction ont mis le doigt sur eIF-4E, qui s'attache à la coiffe 5′ des ARNm. Ainsi, l'insuline stimule la synthèse protéique dans les adipocytes et les cellules musculaires ; cette modulation est due au moins en partie à la phosphorylation de protéines associées à eIF-4E, qui stimule l'activité de eIF-4E et la fréquence d'amorçage de la traduction.

La régulation de la traduction est particulièrement critique chez le jeune embryon. Comme on l'a indiqué au chapitre 6, l'ovule possède toute une série d'ARNm de réserve, inertes jusqu'à la fécondation ou le développement ultérieur de l'embryon. Un des mécanismes qui rend ces ARNm traductibles est la polyadénylation ajustée de ces ARNm ovulaires. Nombre de ces ARNm inertes portent dans l'ovule une très courte queue poly-A (d'environ 20 nucléotides) qui sera portée ultérieurement à plusieurs centaines de nucléotides, et rendra les ARNm traductibles, au stade approprié du développement embryonnaire. En outre, la traduction de certains ARNm au cours du développement embryonnaire semble ajustée par des répresseurs protéiques qui s'attachent à des séquences singulières de leur bout 3′ ; le mécanisme de l'inhibition par ces répresseurs n'est pas connu.

Figure 7.16
Régulation de la traduction par une phosphorylation de eIF-2. Dans le réticulocyte, entièrement chargé de la synthèse d'hémoglobine, la synthèse de globine dépend étroitement de la disponibilité de l'hème, laquelle ajuste l'activité de eIF-2. La forme active de eIF-2 (quand il est chargé de GTP) escorte le méthionyl-ARNt amorceur jusqu'au ribosome (voir figure 7.10). eIF-2 est ensuite libéré du ribosome sous forme inerte, puisque chargé de GDP ; il ne sera réactivé qu'après échange de son GDP contre du GTP. Si l'hème ne manque pas, ce échange s'effectue et la traduction se poursuit. Si l'hème se fait rare, la cellule active une protéine phosphokinase qui phosphoryle eIF-2 ; cette forme étant incapable d'effectuer l'échange GDP :GTP, eIF-2/GTP n'est pas régénéré et la traduction est inhibée.



REPLOIEMENT ET REMANIEMENT DES PROTÉINES

La traduction termine la transmission de l'information génétique dans la cellule ; la séquence des nucléotides de l'ADN s'est muée en la séquence d'acides aminés d'une chaîne polypeptidique, mais une synthèse de polypeptide est loin d'être une production de protéine prête à fonctionner. Pour ce faire, il faut d'abord que le polypeptide se reploie en une conformation spatiale particulière et souvent que plusieurs chaînes polypeptidiques s'unissent en un complexe fonctionnel. En outre, de nombreuses protéines subiront d'autres modifications, par exemple un raccourcissement et l'attachement par covalence de glucides et de lipides qui sont indispensables au fonctionnement et à la mise en place correcte des protéines au sein de la cellule.

Chaperons et reploiement des chaînes polypeptidiques

Comme on l'a expliqué au chapitre 2, la conformation d'une protéine dans l'espace résulte d'interactions entre les chaînes latérales de ses résidus d'acide aminé. La règle classique du reploiement d'une chaîne en protéine est que l'information nécessaire pour atteindre une conformation tridimensionnelle correcte tient tout entière dans la séquence d'acides aminés. Cela fut éta-

bli par les expériences de Christian Anfinsen qui montraient que l'ARNase dénaturée se reploie spontanément *in vitro* en retrouvant sa conformation active (voir figure 2.17). Le reploiement en conformation native paraît donc bien être un processus d'auto-assemblage qui ne requiert aucun facteur cellulaire auxiliaire. Néanmoins des travaux récents ont démontré que le mécanisme précis du reploiement protéique dans la cellule est tout autre : le reploiement dans la cellule est secondé par l'activité d'autres protéines.

Les protéines qui facilitent le reploiement d'autres protéines sont des **chaperons** moléculaires. Ce terme fut jadis employé par Ron Laskey et son groupe pour désigner une protéine (la nucléoplasmine) qui sert à l'assemblage des histones et de l'ADN en nucléosomes ; la nucléoplasmine s'attache aux histones et les arrange en nucléosomes, mais elle n'est pas incorporée à la structure nucléosomique obtenue. Les chaperons agissent donc comme des catalyseurs d'assemblage, sans être eux-mêmes partie de l'ensemble formé. D'autres recherches ont élargi ce concept, notamment aux protéines qui interviennent dans plusieurs autres processus d'assemblage, en particulier le reploiement des chaînes polypeptidiques.

Remarquons que les chaperons n'apportent aucune information supplémentaire requise pour le reploiement des polypeptides en la conformation tridimensionnelle correcte ; celle-ci est déterminée uniquement par la séquence d'acides aminés. Les chaperons catalysent le reploiement en aidant le processus d'auto-assemblage : leur rôle consiste à donner une stabilité, en s'y attachant, aux polypeptides à moitié reployés qui sont des stades intermédiaires de la voie menant à leur forme correctement reployée. En l'absence de chaperons, les chaînes déployées ou à demi reployées sont instables dans la cellule et souvent se replient de manière erronée ou s'associent en formant des complexes insolubles. En s'attachant à ces chaînes non reployées, les chaperons empêchent qu'elles se reployent de façon incorrecte ou qu'elles forment des agrégats, et garantissent qu'elles trouvent finalement leur conformation correcte.

Un bel exemple est celui des chaperons qui, s'attachant aux chaînes polypeptidiques naissantes en croissance sur les ribosomes, évitent que le bout aminé des chaînes ne se replie de façon fautive ou ne s'agrège en complexes insolubles avant que la chaîne ne soit achevée (figure 7.17). On pense que cette interaction est particulièrement critique pour les protéines dont le bout carboxyle (le dernier à sortir du ribosome) est nécessaire au reploiement correct du bout aminé ; dans ce cas, le chaperon maintient le bout aminé dans une conformation déployée jusqu'à ce que le reste de la chaîne polypeptidique soit formé et que la protéine entière se reploie correctement. Les cha-

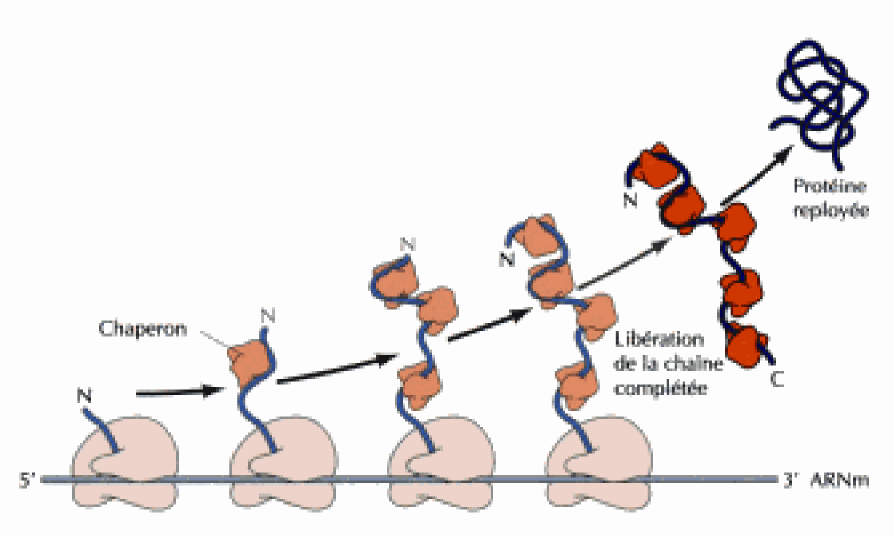


Figure 7.17
Rôle des chaperons pendant la traduction. En s'attachant au bout aminé de la chaîne polypeptidique naissante, des chaperons la maintiennent dans une conformation déployée jusqu'à ce que la synthèse de la chaîne s'achève. Une fois complétée, la chaîne quitte le ribosome et peut se reployer dans la conformation tridimensionnelle correcte.

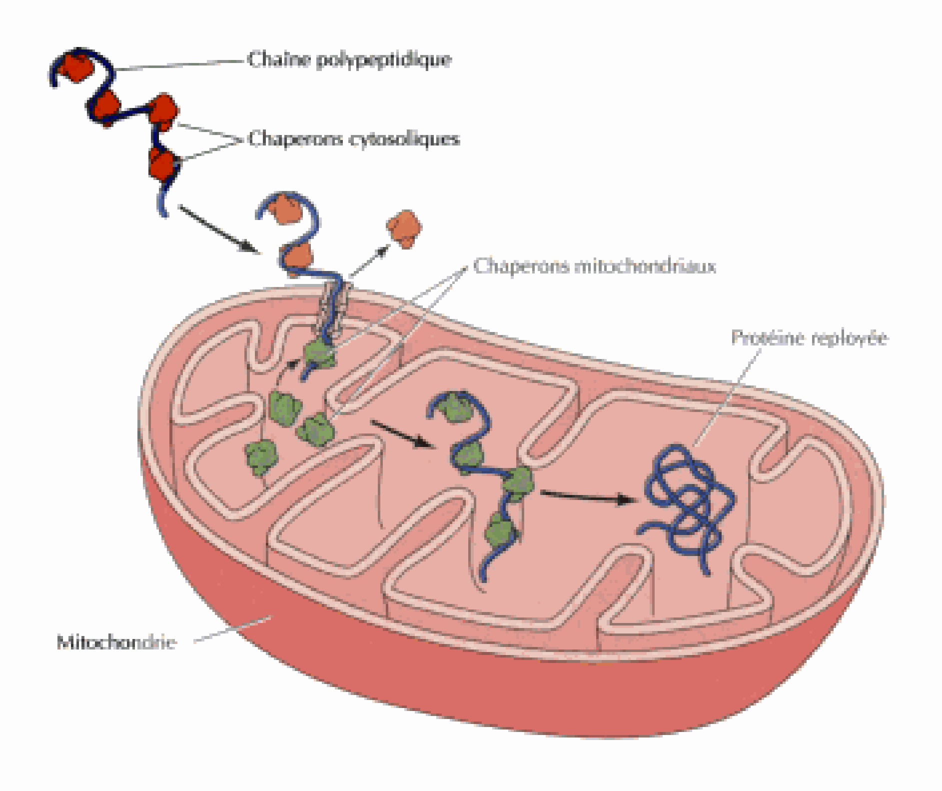


Figure 7.18
Rôle des chaperons lors du transfert d'une protéine. Un polypeptide reployé à demi passe du cytosol à la mitochondrie ; des chaperons du cytosol stabilisent sa conformation déployée. Les chaperons mitochondriaux facilitent son transfert dans l'organite, puis son reploiement définitif.

perons stabilisent aussi certaines chaînes polypeptidiques déployées durant leur transport vers des organites intracytoplasmiques, par exemple lorsque des protéines passent du cytosol à la mitochondrie (figure 7.18). Ces protéines traversent la membrane mitochondriale sous forme d'une conformation partiellement déployée qui est stabilisée par des chaperons du cytosol ; les chaperons mitochondriaux aident la chaîne polypeptidique à traverser la membrane mitochondriale et à se reployer au sein de l'organite. En outre, des chaperons interviennent dans l'assemblage des protéines multimériques, des complexes macromoléculaires (par exemple, la nucléoplasmine) et, comme on le verra plus loin, dans la destruction des protéines.

Une bonne part des protéines servant de chaperons moléculaires (tableau 7.2) furent découvertes en tant que **protéines du choc thermique**, groupe de protéines exprimées par les cellules soumises à des températures élevées ou à d'autres formes de stress infligé par le milieu. Il semble que ces protéines du choc thermique (en abrégé, Hsp), bien conservées des procaryotes aux eucaryotes, stabilisent les protéines dénaturées partiellement par les températures élevées et facilitent leur reploiement, mais beaucoup de membres de la famille des protéines du choc thermique s'expriment et ont un rôle physiologique primordial à jouer dans les conditions de prolifération normale de la cellule. Ces protéines servent de chaperons moléculaires, indispensables au reploiement des polypeptides et à leur transport aussi bien dans les conditions normales qu'en cas de stress infligé par l'environnement.

Parmi les plus importantes protéines du choc thermique impliquées dans la voie de reploiement des protéines des procaryotes et des eucaryotes, se

Tableau 7.2 Chaperons moléculaires

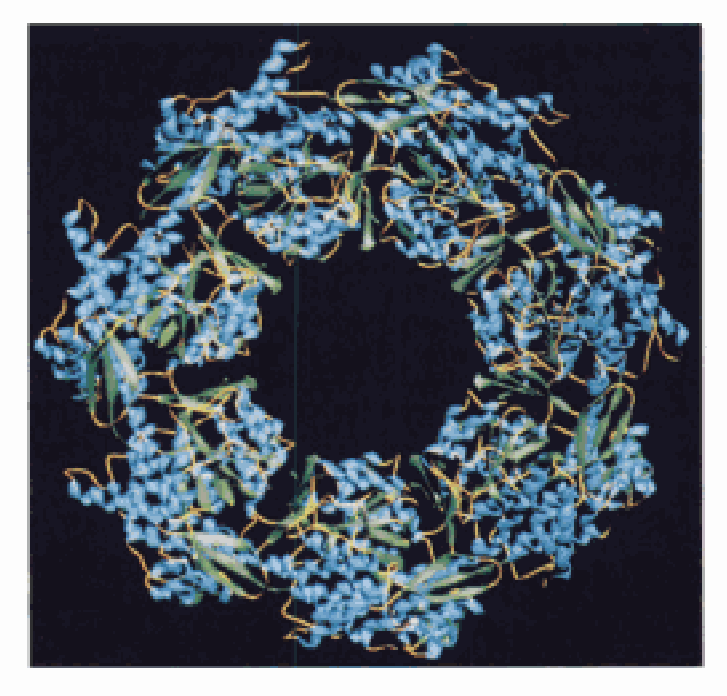
	Protéines chaperons	
Famille	**Procaryotes**	**Eucaryotes**
Hsp70	DnaK	Hsc73 (cytosol)
		BiP (réticulum endoplasmique)
		mHsp70 (mitochondrie)
		ctHsp70 (chloroplaste)
Hsp60	GroEL	Hsp60 (mitochondrie)
		Cpn60 (chloroplaste)
Hsp90	HtpG	Hsp90 (cytosol)
		Grp94 (réticulum endoplasmique)
TRiC	TF55	TriC (cytosol)

trouvent les familles Hsp70 et Hsp60. Les protéines des deux familles agissent en s'attachant aux régions déployées des chaînes polypeptidiques. Les membres de la famille Hsp70 stabilisent les chaînes polypeptidiques déployées tant lors de la traduction (voir, par exemple, la figure 7.17) qu'au cours du transport de polypeptides vers divers compartiments intracellulaires, comme la mitochondrie ou le réticulum endoplasmique ; ces protéines s'attachent à de courts segments (7 ou 8 résidus d'acide aminé) de polypeptides déployés, en maintenant leur chaîne dans une configuration ouverte et en empêchant leur agrégation.

Les membres de la famille Hsp60, appelés aussi **chaperonines**, favorisent le reploiement des protéines en leur conformation native. Chaque molécule comporte 14 protomères d'environ 60 kilodaltons (kd) chacun, assemblés en deux anneaux superposés formant une structure en double manchon (figure 7.19) dont le tunnel cylindrique central accueille une chaîne polypeptidique déployée, en la protégeant du cytosol ; ainsi abritée de l'environnement et attachée à la chaperonine, la chaîne ne s'agrège pas avec d'autres, mais se reploie correctement. L'attachement de la chaîne déployée à une chaperonine est une réaction réversible qui consomme l'énergie de l'ATP ; chaque dépense d'une molécule d'ATP entraîne un cycle de libération et de recapture, par la chaperonine, des zones déployées de la chaîne, ce qui donne au polypeptide le temps de trouver petit à petit sa conformation correcte.

Dans certains cas, il arrive que des membres de la famille Hsp70 et de la famille Hsp60 coopèrent en se relayant : cela se produit, par exemple, lors du transfert de protéines dans la mitochondrie et lors du reploiement de nouvelles chaînes chez *E. coli* (figure 7.20) ; d'abord un chaperon Hsp70 stabilise la chaîne polypeptidique naissante jusqu'à achèvement de sa synthèse, puis cette chaîne encore déployée est transférée à une chaperonine Hsp60, au sein de laquelle la protéine va se reployer correctement pour acquérir sa conformation tridimensionnelle active. Les membres de la famille Hsp70 siègent dans le cytosol et les organites (par exemple, les mitochondries) des cellules d'eucaryote, et il en existe chez les bactéries (voir tableau 7.2). Par contre, les membres de la famille Hsp60 ne se rencontrent que chez les bactéries et les organites eucaryotiques correspondants (mitochondrie et chloroplaste). Néanmoins, le cytosol des cellules d'eucaryote contient des chaperons qui appartiennent à la famille des protéines TRiC, qui forment des structures en double manchon et qui fonctionneraient comme les chaperonines Hsp60 ; le principe de l'entrée en jeu successif de Hsp70 et de Hsp60 serait un mode général du reploiement des chaînes protéiques.

Figure 7.19
Structure d'une chaperonine. GroEL, un membre de la famille des Hsp60, se compose de deux manchons superposés creusés d'un tunnel cylindrique ; chaque manchon est formé de sept protomères (Aimablement transmis par Paul B. Sigler, Yale University).



Enzymes et reploiement des protéines

Outre les chaperons, qui facilitent le reploiement des protéines en s'attachant à leurs intermédiaires partiellement reployés pour les stabiliser, la cellule contient au moins deux types d'enzymes qui catalysent le reploiement protéique en rompant et reformant certaines liaisons covalentes. Pour la stabilité des structures natives de beaucoup de protéines, la formation de liaisons disulfure entre certains de leurs résidus cystéine est primordiale (voir figure 2.16). L'**isomérase des disulfure protéiques** (PDI), découverte par Christian Anfinsen en 1963, catalyse la rupture et la reformation de ces liaisons (figure 7.21). Dans les protéines comportant beau-

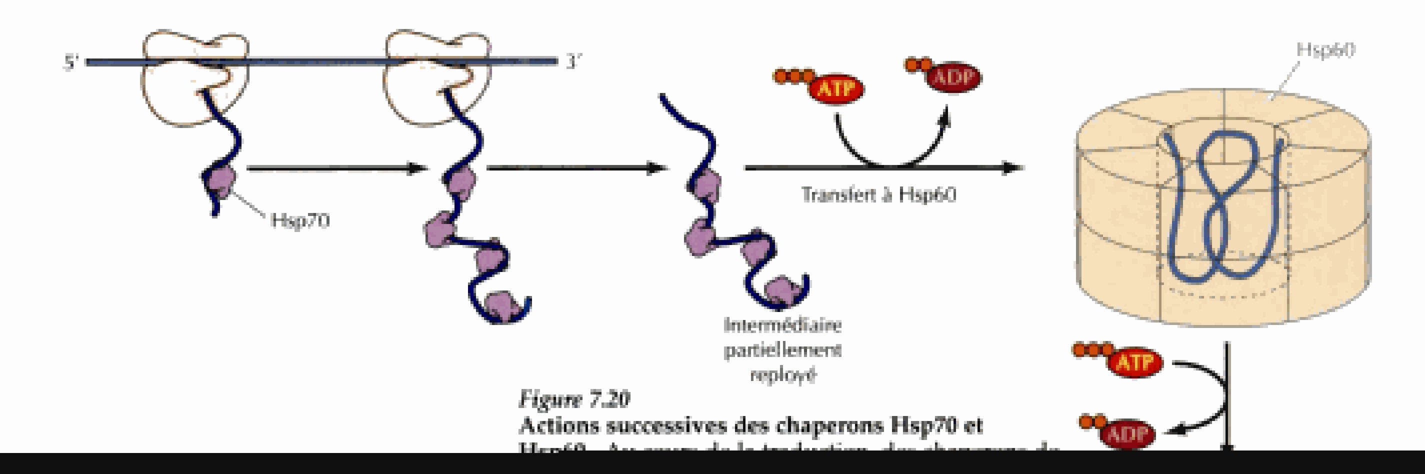


Figure 7.20
Actions successives des chaperons Hsp70 et [redacted]

largement répandu tant chez les procaryotes que chez les eucaryotes et catalyse le reploiement d'au moins certaines protéines ; on ignore cependant quels sont ses substrats habituels et son rôle réel dans la cellule.



Figure 7.22
Rôle de la peptidyl-prolyl isomérase. La peptidyl-prolyl isomérase catalyse l'isomérisation de *cis* en *trans* de la conformation des liaisons peptidiques entreprenant une proline.

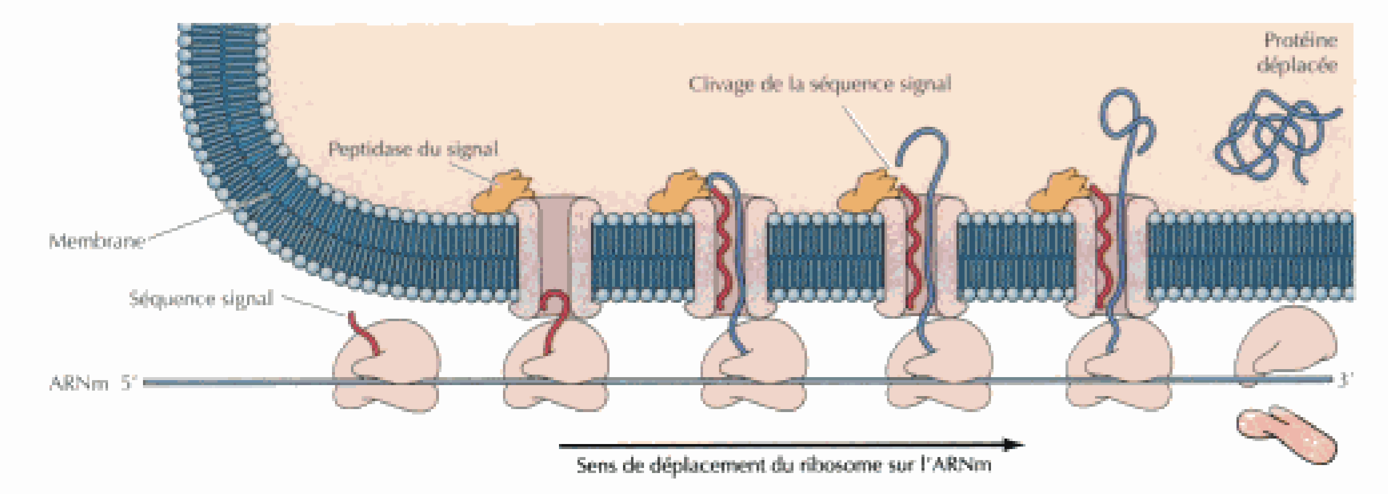
Découpe des protéines

Le tronçonnage des chaînes polypeptidiques (**protéolyse**) est une étape importante de la maturation de maintes protéines. Un cas simple est l'élimination du groupe méthionyle d'amorçage du bout aminé de nombreux polypeptides, qui s'effectue dès que le bout aminé de la chaîne naissante émerge du ribosome ; à ce moment aussi d'autres groupes chimiques, groupe acétyle ou chaînes d'acide gras (nous allons y venir), s'ajoutent au résidu amino-terminal.

Des modifications protéolytiques du bout aminé interviennent aussi dans la translocation de nombreuses protéines au travers des membranes, notamment des protéines sécrétées tant par les bactéries que par les cellules d'eucaryote, ainsi que des protéines devant être incorporées à la membrane plasmique, au lysosome, à la mitochondrie et au chloroplaste des cellules d'eucaryote. Ces protéines signalent leur destination par une étiquette contenue dans leur séquence amino-terminale élaguée par clivage protéolytique au moment où la protéine traverse la membrane. Pendant que la synthèse de la chaîne se poursuit (figure 7.23), des **séquences signal** amino-terminales, par exemple, constituées d'une vingtaine de résidus, entraînent les protéines de sécrétion vers la membrane plasmique des bactéries ou le réticulum endoplasmique des cellules d'eucaryote. Cette séquence signal constituée en majorité de résidus hydrophobes s'insinue dans la membrane au fur et à mesure qu'elle émerge du ribosome, puis le reste de la chaîne polypeptidique la suit dans un tunnel creusé dans la membrane. La séquence signal est ensuite amputée par une protéase propre à la membrane (la **peptidase du signal**) et la protéine remaniée est libérée. Dans la cellule eucaryotique, la translocation des chaînes polypeptidiques naissantes dans le réticulum endoplasmique est le prélude au tri des protéines, qui les aiguillera dans la voie sécrétoire, ou les véhiculera vers la membrane plasmique ou le lysosome. Aux chapitres 9 et 10, nous décrirons les mécanismes qui gouvernent le transfert des protéines vers ces destinations ainsi que le rôle joué par d'autres séquences de ciblage utilisées par la cellule pour importer des protéines dans ses mitochondries et ses chloroplastes.

D'autres importants processus de clivages protéolytiques concernent l'activation de précurseurs d'hormones et d'enzymes. La maturation de l'insuline met en jeu deux clivages ; le précurseur (la prépro-insuline) porte une séquence signal amino-terminale qui envoie le polypeptide au réticulum

Figure 7.23
Rôle des séquences signal dans la translocation à travers une membrane. Les séquences signal dirigent la translocation des chaînes polypeptidiques à travers la membrane plasmique des bactéries ou dans le réticulum endoplasmique d'une cellule d'eucaryote (exemple du dessin). En quittant le ribosome, la séquence signal, série d'acides aminés hydrophobes du bout aminé de la chaîne polypeptidique, s'insinue dans un tunnel membranaire, suivie du reste de la chaîne ; la séquence signal est alors amputée par une peptidase particulière, qui libère la protéine mature raccourcie.



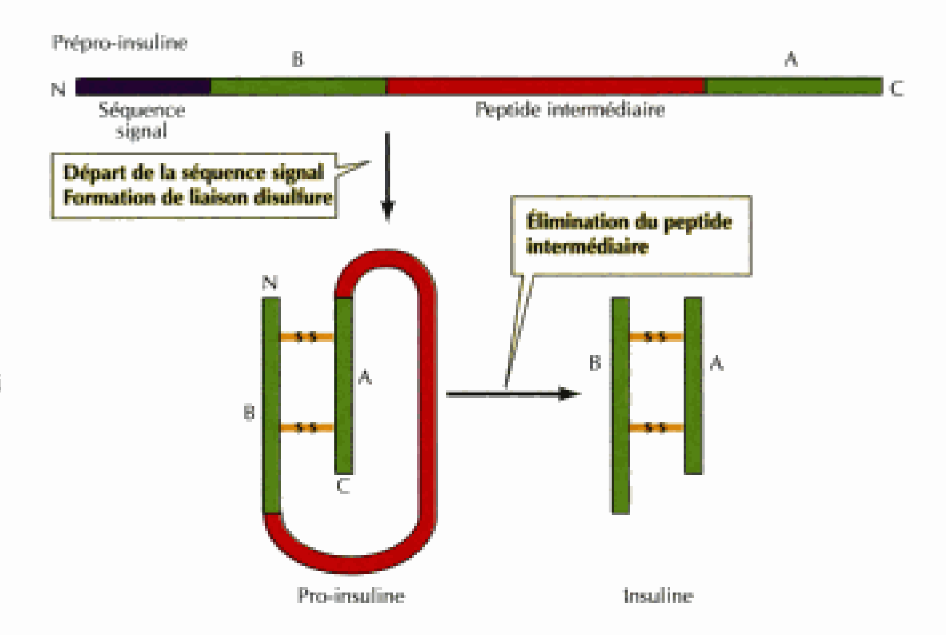


Figure 7.24
Maturation protéolytique de l'insuline. L'insuline mature comprend deux chaînes polypeptidiques (A et B) unies par des liaisons disulfure. Elle est synthétisée sous forme de précurseur (prépro-insuline) contenant une séquence amino-terminale élaguée durant le transfert de la chaîne naissante au réticulum endoplasmique. Ce clivage donne un autre précurseur (pro-insuline) converti enfin en insuline par deux autres clivages protéolytiques qui éliminent un peptide interne.

endoplasmique (figure 7.24) ; l'élagage de cette séquence lors du transfert au réticulum endoplasmique donne un second précurseur appelé pro-insuline, converti ensuite en insuline par excision d'un tronçon peptidique interne ; l'insuline est alors formée de deux chaînes liées par des liaisons disulfure. Parmi les protéines remaniées de cette manière, se trouvent des enzymes de la digestion et des protéines intervenant dans la coagulatoin du sang.

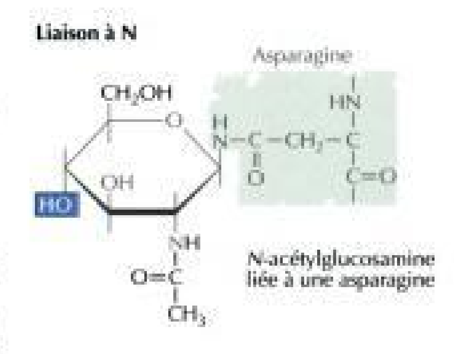
Notons que les protéines de nombreux virus animaux proviennent de clivages de longs précurseurs ; un exemple particulièrement important du rôle joué par la protéolyse dans la réplication virale est fourni par VIH ; pendant sa réplication, c'est une protéase codée par le virus VIH qui découpe les polypeptides précurseurs pour en faire les protéines de structure du virus. Vu son rôle central dans la réplication du virus, la protéase de VIH (au même titre que sa transcriptase inverse) est une cible choisie dans la mise au point de médicaments pour soigner les patients atteints du SIDA.

Glycosylation

De nombreuses protéines, surtout chez les eucaryotes, sont modifiées par addition de glucides, un processus baptisé **glycosylation**. Les protéines pourvues d'une chaîne glycosidique (les **glycoprotéines**) sont en général des protéines destinées à la sécrétion ou à la face externe de la cellule, rarement au compartiment nucléaire ou cytosolique. Les substituants glycosidiques des glycoprotéines sont d'importants sites de reconnaissance pour les interactions de cellule à cellule et d'adressage des protéines au compartiment cellulaire adéquat.

Il existe des glycoprotéines de classe N et des glycoprotéines de classe O, selon le résidu d'acide aminé auquel le groupe glycosidique est fixé (figure 7.25) ; dans les glycoprotéines de classe N, la chaîne glucidique est fixée à l'atome d'azote de la chaîne latérale d'une glutamine, dans celles de classe O, à l'atome d'oxygène de la chaîne latérale d'une sérine ou d'une thréonine ; les glucides directement soudés à ces résidus sont en général soit la *N*-acétylglucosamine soit la *N*-acétylgalactosamine, respectivement.

La plupart des glycoprotéines de la cellule eucaryotique seront soit excrétées soit incorporées à la membrane plasmique. Elles sont d'abord, pendant leur synthèse, transférées au réticulum endoplasmique (avec clivage de leur séquence signal) ; c'est là que commence la glycosylation, avant même que



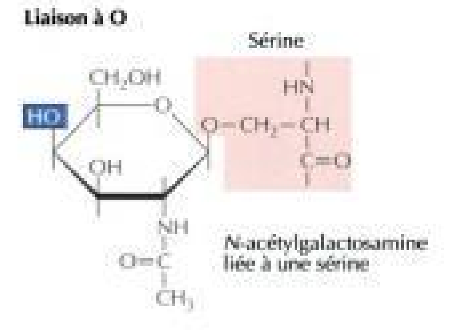


Figure 7.25
Liaison de chaînes glucidiques aux protéines. Les chaînes glucidiques de classe N sont attachées à un résidu asparagine, celles de classe O à un résidu de sérine ou de thréonine ; les sucres en jeu sont dans le premier cas la *N*-acétylglucosamine et dans le second cas la *N*-acétylgalactosamine

la chaîne soit entièrement synthétisée. Le processus débute par le transfert d'un oligosaccharide commun composé de 14 résidus (2 *N*-acétylglucosamines, 3 glucoses et 9 mannoses) à un résidu asparagine de la chaîne polypeptidique en croissance (figure 7.26). Cet oligosaccharide est assemblé dans le réticulum endoplasmique, sur un porteur lipidique, le **phosphate de dolichol**, puis transféré en bloc au résidu accepteur asparagine (Asn) d'une séquence -Asn-X-Sér- ou -Asn-X-Thr- (où X est tout acide aminé autre que la proline).

La maturation continue par un remaniement de l'oligosaccharide de classe N commun ; dans le réticulum endoplasmique, trois résidus de glucose et un de mannose lui sont enlevés ; les glycoprotéines passent ensuite dans l'appareil de Golgi, pour y subir d'autres modifications (décrites au chapitre 9), à savoir des amputations et des ajouts de résidus glucidiques, selon le compartiment du Golgi où les glycoprotéines séjournent (figure 7.27). Les

Figure 7.26
Synthèse d'une glycoprotéine de classe N. La glycosylation débute dans le réticulum endoplasmique (RE) par l'addition à la chaîne polypeptidique naissante d'un oligosaccharide composé de 14 résidus glycosyle. Cet oligosaccharide, formé de deux *N*-acétylglucosamines, neuf mannoses et trois glucoses, s'assemble sur un porteur lipidique (le phosphate de dolichol) dans la membrane du RE. Il est ensuite transféré d'un bloc à un résidu d'asparagine accepteur du polypeptide.

ARNm
Membrane du RE
Phosphate de dolichol
Asn
N
N-acétylglucosamine
Mannose
Glucose
Asn
N

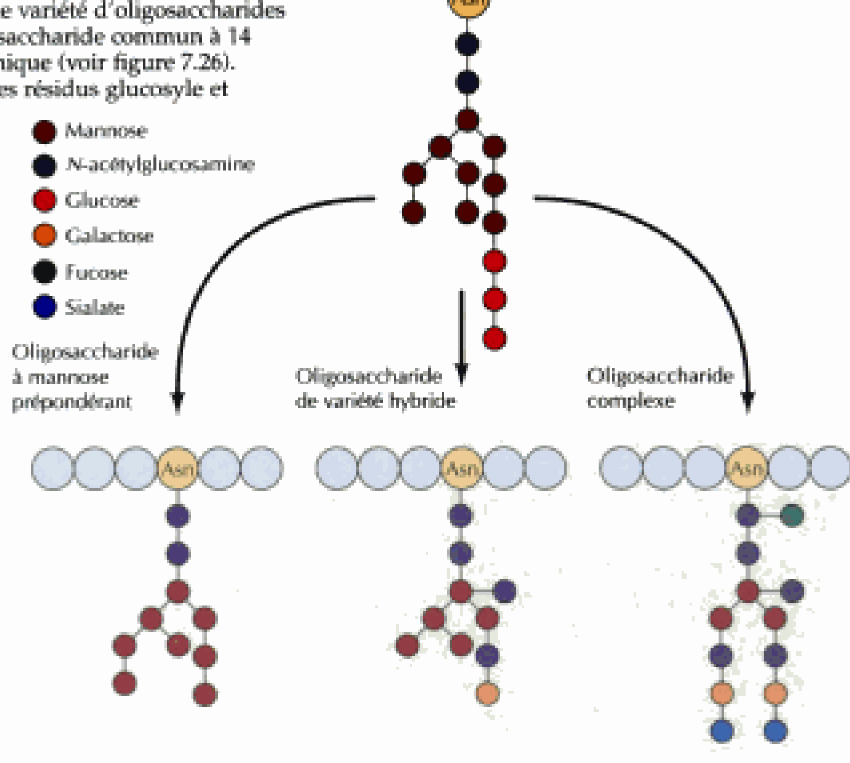


Figure 7.27
Exemples d'oligosaccharides liés à N. Une variété d'oligosaccharides se forment *via* des modifications de l'oligosaccharide commun à 14 résidus greffé dans le réticulum endoplasmique (voir figure 7.26). Dans la variété à mannose prépondérant, les résidus glucosyle et certains résidus mannosyle sont éliminés et il n'y a plus d'ajout de sucres à la chaîne restante ; dans la variété complexe, d'autres mannosyle sont éliminés et d'autres glucides ajoutés ; les oligosaccharides hybrides sont des intermédiaires entre la variété à mannose prépondérant et la variété complexe. Les structures dessinées sont des exemples typiques.

oligosaccharides de classe N des différentes glycoprotéines seront remaniés plus ou moins profondément, selon la nature des enzymes présents dans [redacted]

de hydrophobe va entrer en interaction (voir figure 2.48). On connaît trois types de groupes lipidiques ajoutés–*N*-myristyle, prényle et palmityle — à des protéines d'eucaryote qui se placent à la face cytoplasmique de la membrane plasmique. Un quatrième type de substituant, un glycolipide, joue un rôle crucial par son attachement à certaines glycoprotéines qui gagnent la face extracellulaire de la membrane plasmique.

Il existe des protéines dont le bout amino-terminal de la chaîne naissante reçoit, pendant la traduction, un groupe d'acide myristique (un acide gras à 14 carbones) ; cette ***N*-myristylation** se produit sur l'azote du résidu glycine initial (figure 7.29) ; ce résidu est en général incorporé à la suite du résidu méthionine amorceur, qui est amputé par protéolyse avant le greffage de l'acide gras. Beaucoup de protéines ainsi modifiées sont ancrées à la face interne de la membrane plasmique ; on a élucidé le rôle joué par l'acide gras dans cet ancrage grâce à l'étude de protéines mutées en remplaçant cette glycine par une alanine : la myristylation n'a plus lieu et la protéine n'exerce [redacted]

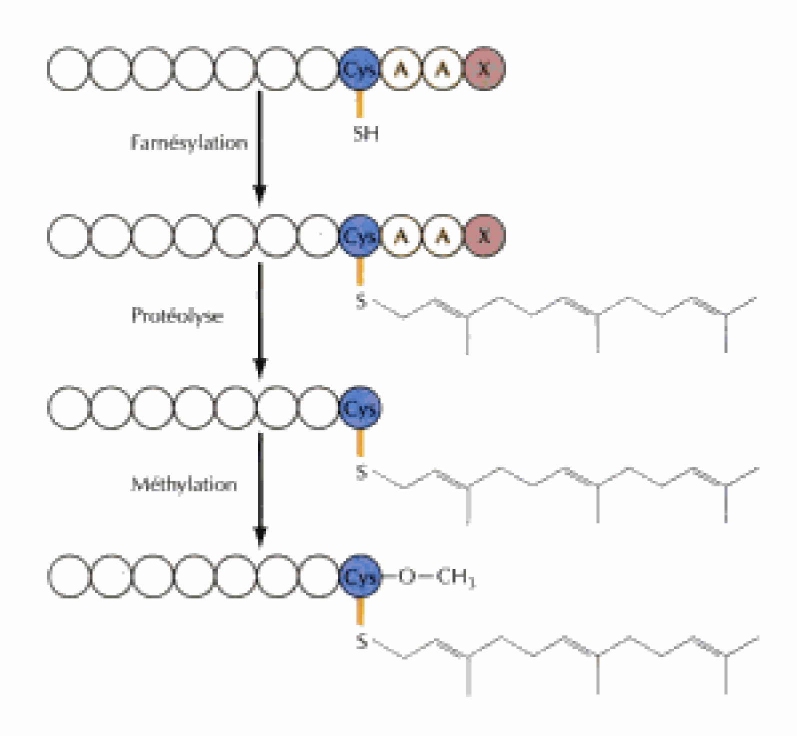


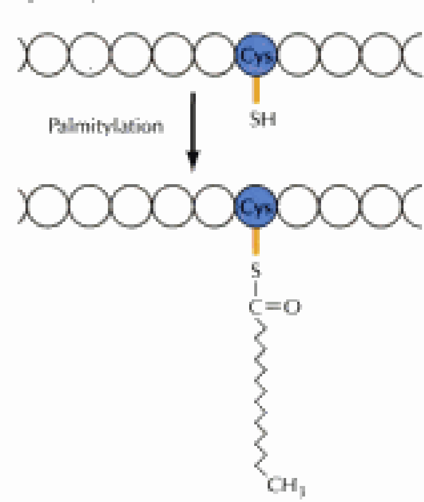
Figure 7.30
Prénylation d'un résidu C-terminal de cystéine. Le type de prénylation indiqué frappe les protéines Ras et des protéines de l'enveloppe nucléaire (les lamines nucléaires). Ces chaînes protéiques se terminent par un résidu cystéine (Cys) suivi de deux résidus d'acide aminé aliphatiques (A) et d'un autre résidu (X) C-terminal. Le remaniement commence par l'addition d'un groupe farnésyle (à 15 carbones) à la chaîne latérale d'une cystéine (farnésylation), suivie de l'élimination protéolytique des trois résidus C-terminaux et de la méthylation du résidu cystéine, à présent terminal.

cliniciens d'évaluer leur efficacité dans le traitement des cancers chez l'Homme.

Dans le troisième type de substitution par un groupe acyle gras, la **palmitylation**, c'est l'acide palmitique (à 16 carbones) qui est greffé à l'atome de soufre d'un résidu cystéine interne (figure 7.31). Comme c'est le cas des *N*-myristylation et prénylation, le transfert de groupe palmitique joue un rôle primordial dans l'ancrage de certaines protéines à la face cytosolique de la membrane plasmique.

Enfin, la cellule transfère certains lipides conjugués à des glucides (**glycolipides**) au groupe carboxyle-terminal de certaines de ses protéines, où ils servent d'ancre à des protéines de la face externe de la membrane plasmique ; comme les glycolipides greffés à ces protéines contiennent du phosphatidylinositol, on les appelle **ancres à glycosylphosphatidylinositol**, ou **ancres GPI** (figure 7.32). La portion oligosaccharidique de l'ancre GPI est liée au groupe carboxyle terminal de la chaîne polypeptidique ; comme la tête polaire inositol du phosphatidylinositol, elle, est liée à l'oligosaccharide, celui-ci sert de pont entre la protéine et les chaînes d'acide gras du phospholipide. L'ancre GPI est préassemblée dans le réticulum endoplasmique puis y est transférée en bloc à la protéine, en même temps qu'en est éliminée, au bout carboxyle, un peptide d'environ 20 résidus d'acide aminé. Ainsi remaniée, la protéine est véhiculée à la surface de la cellule, où les chaînes d'acide gras de son ancre GPI la maintiennent accrochée à la membrane.

Figure 7.31
Palmitylation. Un groupe palmitate (acide gras à 16 carbones) est greffé à la chaîne latérale d'un résidu cystéinyle interne.



RÉGULATION DE LA FONCTION DES PROTÉINES

Un rôle clé joué par les protéines est le pouvoir catalytique qu'elles exercent en tant qu'enzymes dans presque toutes les réactions biologiques. La régulation de cette activité enzymatique jouera donc un rôle central dans le comportement d'une cellule ; cette régulation s'exerce en partie par ajustement de l'expression des gènes, qui fixe la quantité d'enzyme (protéine) synthétisée par la cellule, mais aussi par régulation du fonctionnement de la protéine, qui permet à la cellule d'adapter et la quantité d'un constituant protéique et son activité. Nous avons montré dans ce chapitre et dans le précédent que

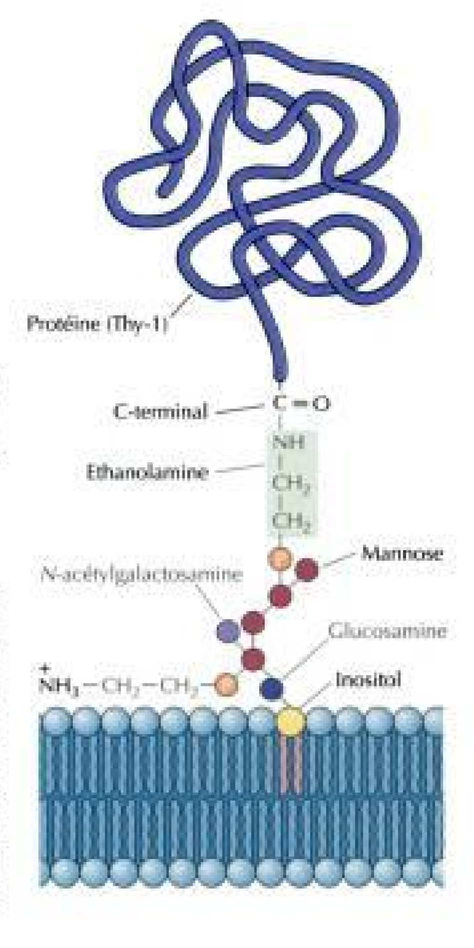


Figure 7.32
Structure d'une ancre GPI. Greffée au C-terminal de la protéine, l'ancre GPI arrime celle-ci à la membrane plasmique. L'ancre est soudée au résidu d'acide aminé C-terminal par son groupe éthanolamine, liée elle-même à un oligosaccharide constitué de résidus mannosyl-phosphate, *N*-acétylgalactosamine et glucosamine ; l'autre bout de l'oligosaccharide est uni au groupe polaire inositol du phosphatidylinositol. Les deux acides gras de ce lipide sont enfouis dans la membrane plasmique. L'ancre GPI illustrée ici est celle d'une protéine de rat, Thy-1.

l'activité de certaines protéines en jeu dans la transcription et la traduction était modulable et nous serons témoins dans le reste de ce traité de bien d'autres exemples de régulations qui adaptent l'activité des protéines au comportement cellulaire. Cette section décrit les trois mécanismes principaux qui permettent à la cellule d'ajuster l'activité de ses protéines.

Régulation par de petites molécules

La modulation de l'activité de la plupart des enzymes repose sur un changement de conformation qui modifie leur activité catalytique. Dans bien des cas, ce changement de conformation est dû à l'attachement à l'enzyme de petites molécules, notamment d'acides aminés ou de nucléotides, qui changent son pouvoir catalytique. C'est à ce type de régulation qu'on attribue d'habitude la commande des voies métaboliques par rétro-inhibition, quand, par exemple, le produit final de nombreuses voies biosynthétiques (notamment celle des acides aminés) inhibe les enzymes qui catalysent l'étape d'engagement de leur synthèse, garantissant de ce fait un apport adéquat du produit final sans en permettre une synthèse excessive (figure 7.33).

La rétro-inhibition est un exemple de **régulation allostérique**, dans laquelle une molécule régulatrice s'attache à un site distinct du site catalytique de l'enzyme ; en changeant la conformation de la protéine, la fixation de cette molécule régulatrice modifie la forme du site catalytique ainsi que l'activité catalytique (voir figure 2.29). L'un des enzymes allostériques bien connus est l'aspartate transcarbamylase qui catalyse la première étape de la synthèse des nucléotides pyrimidiniques, réprimée par le triphosphate de cytidine (CTP). L'aspartate transcarbamylase est constituée de 12 protomères, dont six catalytiques et six régulateurs ; dès que CTP s'est fixé aux protomères régulateurs, la molécule subit

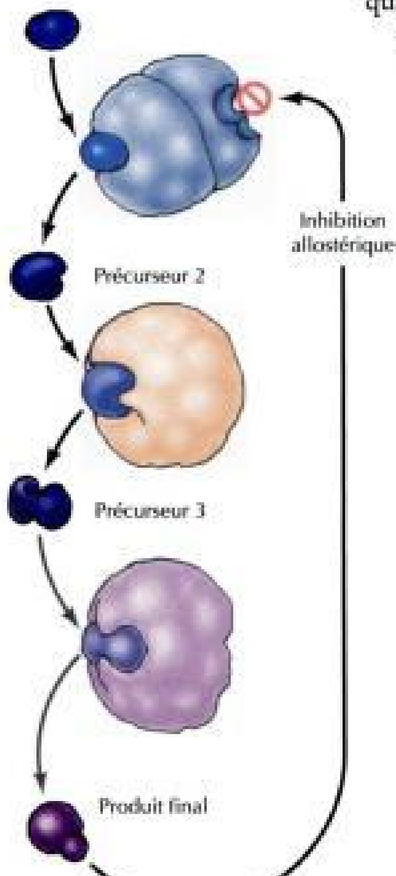
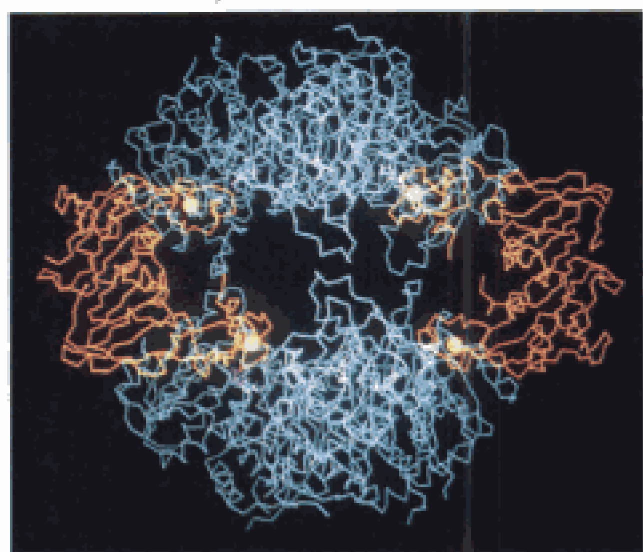


Figure 7.33
Inhibition par rétro-action. Le produit final d'une voie métabolique sert d'inhibiteur allostérique de l'enzyme qui catalyse la première étape (l'étape d'engagement) de sa synthèse.

Conformation de l'enzyme actif



Conformation de l'enzyme inerte

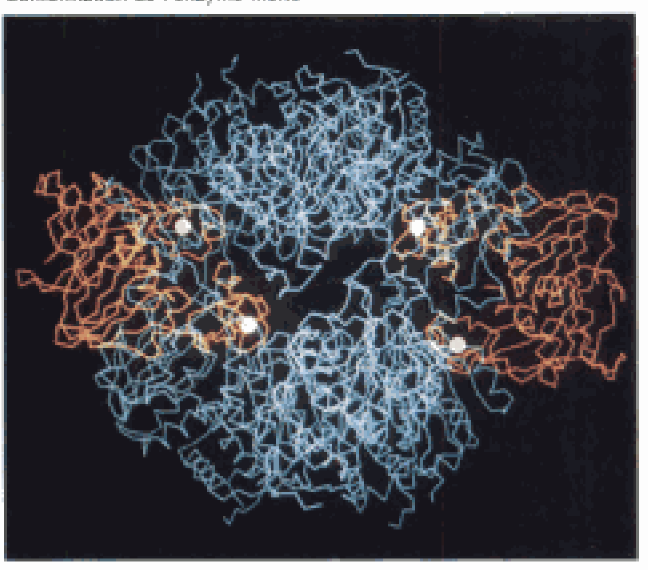


Figure 7.34
Régulation allostérique de l'aspartate transcarbamylase. L'assemblage de deux protomères catalytiques (en vert) avec deux protomères régulateurs (en orange) est illustré pour les deux formes, active et inerte, de l'aspartate transcarbamylase. L'enzyme natif comporte six protomères catalytiques et six protomères régulateurs. (Aimablement transmis par Irving Geis. Copyright Geis & Gouaux, d'après les coordonnées de W. N. Lipscomb.)

Figure 7.35
Différences de conformation entre les protéines Ras actives et inactives. Les protéines Ras passent d'une forme liée au GTP et active à une forme liée au GDP et inactive. La différence réside dans un changement de conformation de deux régions de la molécule appelées bascule I et bascule II (switch I et II). On a tracé le modèle squelettique du complexe avec GTP en blanc, celui du complexe avec GDP dans la zone de bascule I en bleu et dans la zone de bascule II en jaune ; le nucléotide de guanine est coloré en rouge et Mg^{2+} en jaune. (Aimablement communiqué par Sung-Hou Kim, University of California, Berkeley)



un réarrangement important de la position de ses protomères, qui freine l'activité enzymatique (figure 7.34).

L'activité de nombreux facteurs de transcription (décrits au chapitre 6) est aussi ajustée par la fixation de petites molécules. Quand le lactose ou un de ses métabolites s'attache au répresseur *lac* de *E. coli*, il y induit un changement de conformation qui empêche le répresseur de s'attacher à l'ADN. On observe l'effet opposé dans l'opéron arabinose : quand l'arabinose se lie à la protéine AraC, le changement de conformation qu'elle y produit n'inhibe pas son attachement à l'ADN, mais le stimule. Dans la cellule d'eucaryote, les hormones stéroïdes commandent de la même façon l'expression des gènes en se fixant à des protéines régulatrices de la transcription.

L'activité de certains facteurs régulateurs de la traduction, tel que EF-Tu, par attachement de GTP (voir figure 7.12) témoigne d'un autre mécanisme courant qui adapte le fonctionnement de certaines protéines intracellulaires ; dans ce cas, la protéine chargée de GTP adopte la conformation active, alors que, chargée de GDP, elle est inerte. Beaucoup de protéines cellulaires sont [redacted]

forme chargée de GTP à sa forme chargée de GDP, et aux conformations correspondantes, de sorte qu'elle n'est active qu'après stimulation de la cellule par les hormones et les facteurs de croissance qui ajustent la prolifération cellulaire des organismes pluricellulaires.

Phosphorylation des protéines

Les exemples cités dans la section précédente concernaient l'association non covalente de protéines avec de petites molécules activatrices ou inhibitrices ; comme, sans lien covalent, la fixation de ces petites molécules à une protéine est aisément réversible, la cellule répond vite aux modifications de son environnement. Cependant, le fonctionnement de beaucoup de protéines est aussi modulé par des remaniements covalents ; c'est le cas de l'activation de certains enzymes protéolytiques par clivage de leur précurseur inerte. Nous avons mentionné que les enzymes digestifs et les facteurs de coagulation sanguine sont activés de cette manière ; comme la protéolyse est irréversible, elle est un moyen d'enclencher l'activité enzymatique et pas de l'ajuster vers le haut ou vers le bas selon les conditions du milieu. D'autres modifications covalentes, au contraire, comme la phosphorylation, sont entièrement réversibles dans la cellule et agissent comme le ferait une régulation allostérique, à savoir en activant ou inhibant tout une série de protéines faisant partie de systèmes sensibles à des signaux extérieurs.

La phosphorylation des protéines est catalysée par des **protéine kinases**, qui dans la plupart des cas transfèrent une groupe phosphoryle de l'ATP au groupe hydroxyle d'une chaîne latérale de résidu sérine, thréonine ou tyrosine (figure 7.36). La plupart des protéine-kinases phosphorylent soit des résidus sérine et thréonine, soit des résidus tyrosine ; ce sont respectivement des **protéine kinases spécifiques des sérine/thréonine** et des **protéine kinases spécifiques de la tyrosine**. La réaction inverse, de déphosphorylation, effectuée par des **protéine phosphatases**, est l'hydrolyse des liaisons ester phosphate des résidus d'acide aminé. En général, les protéines phosphatases sont, comme les protéines kinases, spécifiques de résidus sérine/thréonine ou de résidus tyrosine, bien que certaines protéine phosphatases s'attaquent à tous les acides aminés phosphorylés.

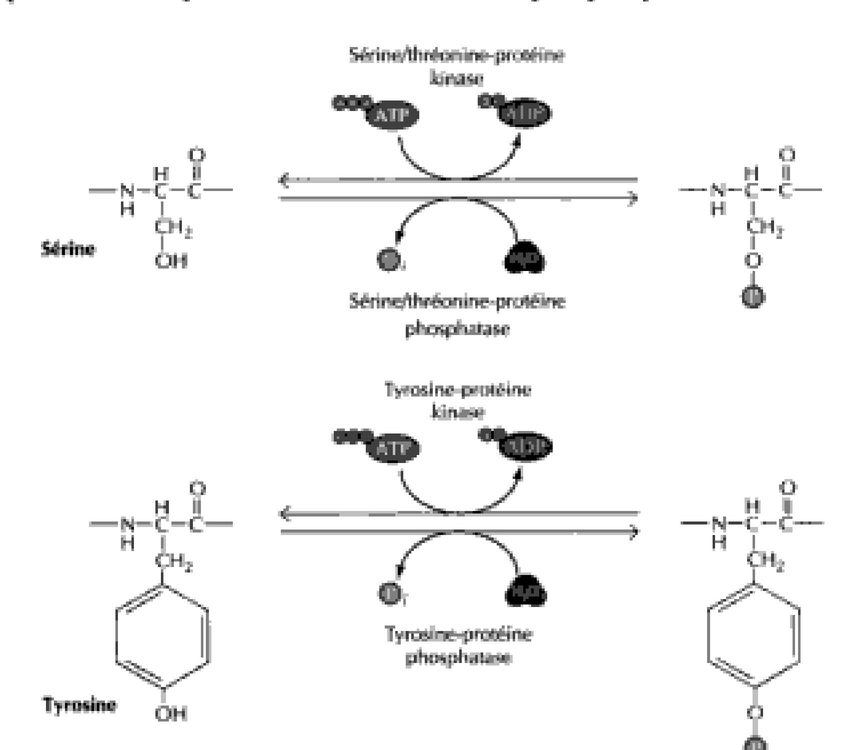


Figure 7.36
Protéine kinase et protéine phosphatase. Une protéine kinase catalyse le transfert d'un groupe phosphoryle de l'ATP à des chaînes latérales de résidus sérine et thréonine (sérine/thréonine-protéine kinase) ou de résidus tyrosine (tyrosine-protéine kinase). Une protéine phosphatase catalyse l'élimination des groupes phosphoryle de ces acides aminés par hydrolyse.

L'effet combiné des kinases et phosphatases qui ont des protéines comme substrat effectue la phosphorylation réversible de beaucoup de protéines cellulaires. Les protéine kinases font souvent partie de voies de transmission de signaux où une première kinase en active une seconde, qui en activera éventuellement encore une troisième ; grâce à cette cascade de protéine kinases, tout signal atteignant la surface de la cellule se transmet à des protéines cibles du cytoplasme, qui gouvernent les modifications du comportement cellulaires face aux stimuli du mili

Le concept de protéine kinase est né

quelle, elle est inerte, car les protomères régulateurs inhibent les protomères catalytiques. Dès que de l'AMPc va se fixer aux protomères régulateurs, apparaît une transconformation qui libère les protomères catalytiques de leur association avec les protomères régulateurs et démasque leur activité de protéine kinase. L'AMPc agit donc ici comme régulateur allostérique puisqu'il modifie l'interaction d'une protéine avec sa voisine.

Les régulateurs transcriptionnels décrits au chapitre 6 témoignent aussi de l'importance des interactions entre protéines. De nombreux facteurs de transcription eucaryotiques tiennent leur pouvoir activateur ou répresseur d'interactions avec des composants de la machinerie transcriptionnelle de base ; nous verrons plus loin que de semblables interactions entre protéines, asservies elles-mêmes à une phosphorylation ou à l'attachement de petites molécules, tiennent des rôles clé dans l'ajustement de beaucoup d'aspects de la physiologie cellulaire.

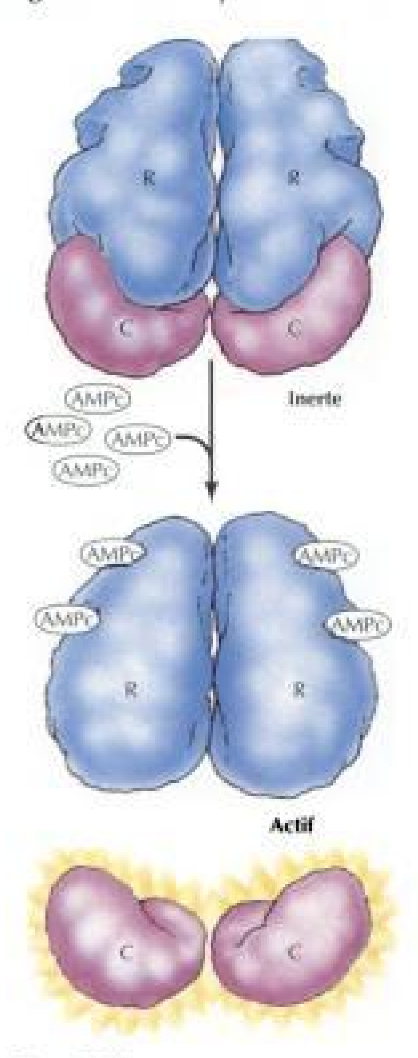


Figure 7.38
Régulation de la protéine-kinase asservie à l'AMPc. À l'état inerte, l'enzyme comporte deux protomères régulateurs (R) et deux protomères catalytiques (C). En se fixant aux protomères régulateurs, l'AMPc provoque un changement de conformation qui les fait se séparer des protomères catalytiques ; libérés, ceux-ci acquièrent leur activité catalytique.

DESTRUCTION DES PROTÉINES

Le teneur en protéines de la cellule n'est pas seulement dictée par la vitesse de leur synthèse, mais aussi par celle de leur destruction. La demi-vie d'une protéine intracellulaire varie dans une grande marge, allant de quelques minutes à quelques jours et la vitesse de leur destruction, particulière à chaque espèce protéique, est un point important de la régulation cellulaire. Bon nombre de protéines rapidement détruites sont des molécules régulatrices, comme le sont les facteurs de transcription ; leur destruction rapide est nécessaire pour que leur taux se modifie rapidement en réponse à des stimuli extérieurs. D'autres protéines sont aussi rapidement détruites en réponse à des signaux particuliers, un mécanisme grâce auquel la cellule ajuste l'activité de ses enzymes. En outre, les protéines mal bâties ou endommagées sont reconnues comme telles et bientôt détruites dans la cellule, empêchant ainsi les désavantages dus aux erreurs produites pendant la traduction. La cellule eucaryotique dispose de deux voies principales pour détruire une protéine, la voie ubiquitine/protéasome et la protéolyse lysosomiale.

Voie de l'ubiquitine et du protéasome

Une voie importante de destruction sélective de protéines dans les cellules d'eucaryote utilise l'**ubiquitine** comme étiquette pour indiquer quelles sont les protéines cytosoliques et nucléaires qu'il est temps de détruire rapidement (figure 7.39). L'ubiquitine est un polypeptide de 76 résidus d'acide aminé, bien conservée chez tous les eucaryotes (levures, animaux et plantes). Toute protéine bonne à éliminer est marquée par attachement d'ubiquitine au groupe aminé d'un résidu lysine, puis d'autres molécules d'ubiquitine viennent se greffer à la première pour constituer un polymère d'ubiquitine ; ces protéines poly-ubiquitinylées sont reconnues et détruites par un grand complexe protéasique multiprotéique appelé **protéasome**. Libérée au cours du processus de destruction de la protéine cible, l'ubiquitine est réutilisée pour de nouveaux cycles ; notons que l'attachement de l'ubiquitine et la destruction des protéines ainsi marquées exigent une dépense d'ATP.

Comme l'attachement de l'ubiquitine à une protéine voue celle-ci à une rapide destruction, la stabilité de maintes protéines est dictée par le fait qu'elles réagissent ou non avec l'ubiquitine. L'ubiquitinylation se passe en plusieurs étapes ; l'ubiquitine est d'abord activée, en s'attachant à l'enzyme activateur de l'ubiquitine, E1, puis elle est transférée à un second enzyme, l'enzyme conjuguant l'ubiquitine (E2). Parfois, l'ubiquitine est transférée de E2 à la protéine cible, mais elle est plus souvent transférée à un troisième enzyme (l'ubiquitine ligase, ou E3), puis à la protéine cible. E1 est un représentant unique dans la plupart des cellules, mais les enzymes E2 et E3 appar-

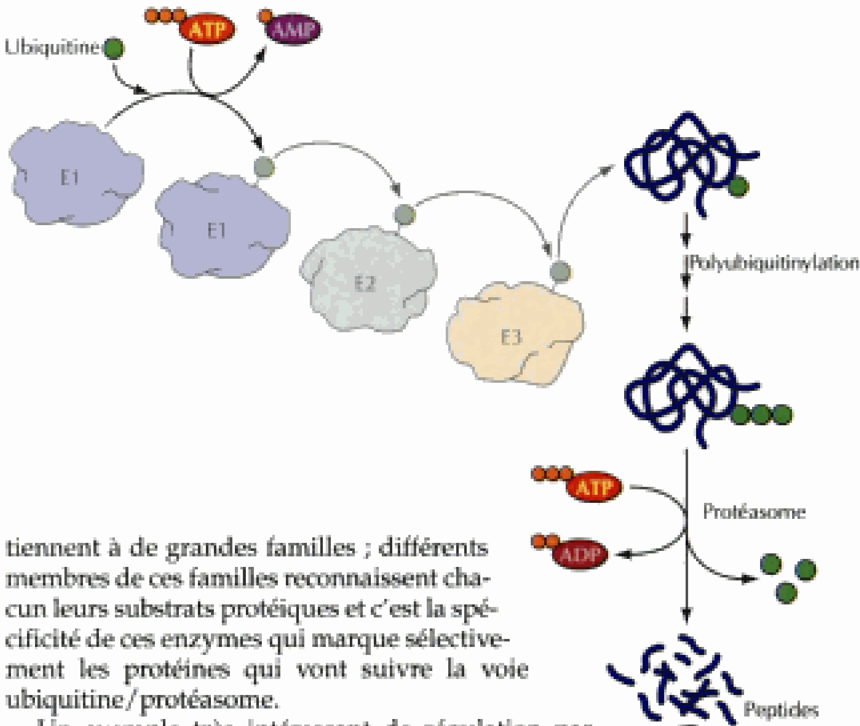


Figure 7.39
Voie de l'ubiquitine et du protéasome. Les protéines à détruire rapidement sont marquées par attachement covalent d'une série de molécules d'ubiquitine. L'ubiquitine est d'abord activée par l'enzyme E1, puis elle est transférée à l'un des enzymes conjuguant l'ubiquitine (E2). Dans la plupart des cas, elle est transférée à l'ubiquitine ligase (E3), puis à la protéine cible. Plusieurs molécules d'ubiquitine viennent s'ajouter avant que la protéine couplée à une chaîne de poly-ubiquitine soit détruite par un complexe de protéases (le protéasome).

tiennent à de grandes familles ; différents membres de ces familles reconnaissent chacun leurs substrats protéiques et c'est la spécificité de ces enzymes qui marque sélectivement les protéines qui vont suivre la voie ubiquitine/protéasome.

Un exemple très intéressant de régulation par destruction protéique *via* le système de l'ubiquitine concerne les cyclines, des protéines qui gouvernent le passage aux diverses étapes du cycle cellulaire des eucaryotes (figure 7.40). L'entrée en mitose de toutes les cellules d'eucaryote est commandée en partie par la cycline B, protomère régulateur d'une protéine kinase appelée Cdc2 (voir chapitre 14). L'association de la cycline B à Cdc2 est indispensable à l'activation de la Cdc2 kinase qui, en phosphorylant plusieurs protéines cellulaires, enclenche les événements de la mitose (y compris la condensation des chromosomes et le démembrement de l'enveloppe nucléaire). Cdc2 active aussi un système protéolytique asservi à l'ubiquitine, qui détruit la cycline quand la mitose touche à sa fin ; cette destruction de la cycline B inactive Cdc2, permettant à la cellule de terminer sa mitose et d'aborder l'interphase d'un nouveau cycle cellulaire. L'ubiquitinylation de la cycline B est une réaction très sélective, désignée par une séquence de 9 résidus (la boîte de destruction) de la cycline B. Les mutations de cette séquence empêchent la protéolyse de la cycline B et bloquent le cycle cellulaire en pleine mitose, montrant par ce fait combien la destruction ajustée d'une protéine gouverne le processus fondamental de la division cellulaire.

Protéolyse lysosomiale

L'autre voie importante de destruction des protéines de la cellule eucaryotique requiert leur entrée dans le **lysosome**. Le lysosome est un organite bordé d'une membrane et pourvu de tout une panoplie d'enzymes digestifs, dont plusieurs protéases (voir chapitre 9) ; ils remplissent plusieurs fonctions dans le métabolisme cellulaire, notamment celui de digérer les protéines extracellulaires introduites par endocytose et de participer au renouvellement des protéines du cytosol et des organites.

Le confinement des protéases et autres enzymes digestifs dans le lysosome met la cellule à l'abri d'une destruction de ses composants ; aussi les protéines cellulaires mises au rebut doivent-elles d'abord être captées par le lysosome. L'une des voies d'entrée des protéines, l'**autophagie**, met en jeu la formation de vésicules (autophagosomes) dans lesquelles de petites zones

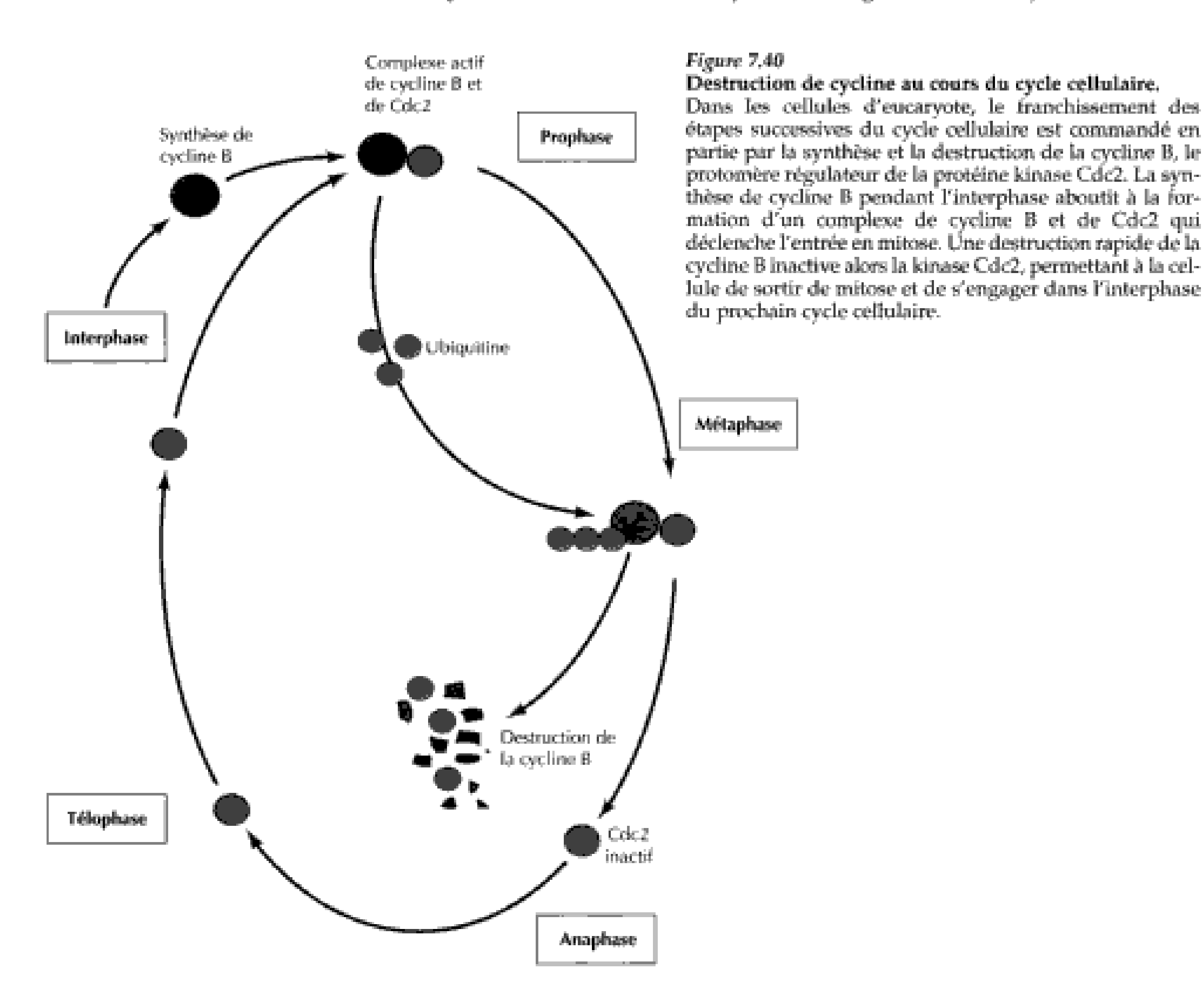
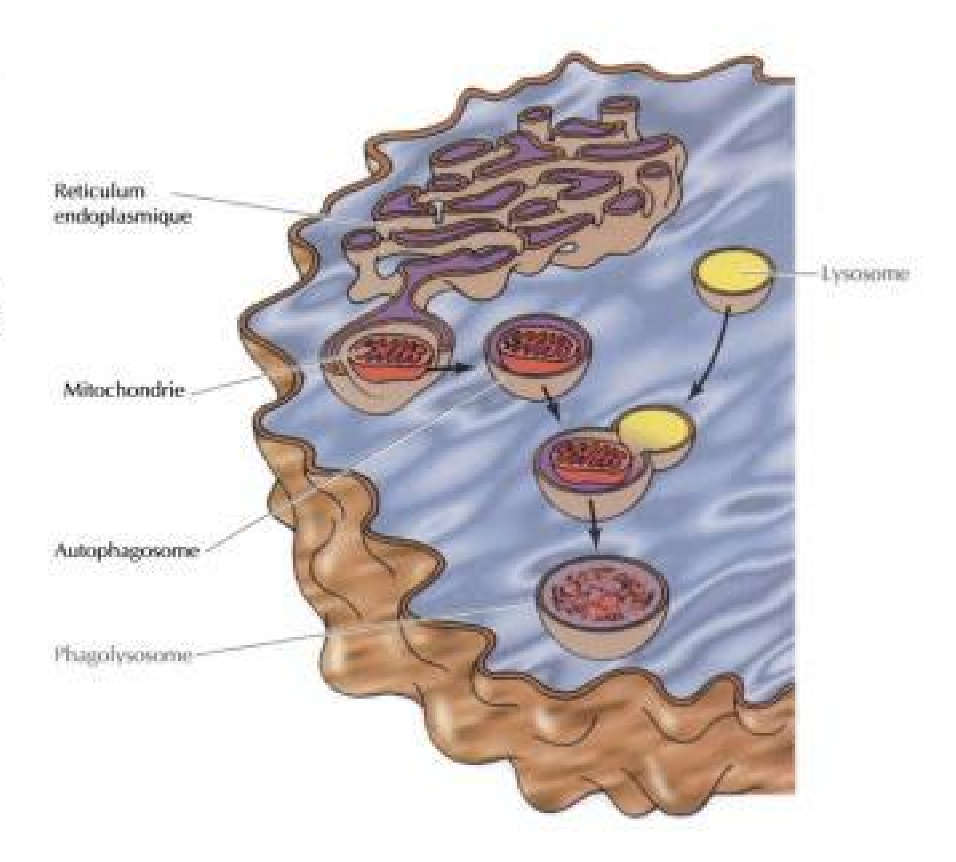


Figure 7.40
Destruction de cycline au cours du cycle cellulaire.
Dans les cellules d'eucaryote, le franchissement des étapes successives du cycle cellulaire est commandé en partie par la synthèse et la destruction de la cycline B, le protomère régulateur de la protéine kinase Cdc2. La synthèse de cycline B pendant l'interphase aboutit à la formation d'un complexe de cycline B et de Cdc2 qui déclenche l'entrée en mitose. Une destruction rapide de la cycline B inactive alors la kinase Cdc2, permettant à la cellule de sortir de mitose et de s'engager dans l'interphase du prochain cycle cellulaire.

de cytoplasme ou d'organite sont enclavées par des membranes dérivées du réticulum endoplasmique (figure 7.41) ; ces vésicules fusionnent ensuite avec les lysosomes et les enzymes lysosomiaux détruisent les composants de la lumière du lysososme. Comme la prise de protéines par les autophagosomes n'est, semble-t-il, pas sélective, il arrive que des protéines cytoplasmiques de longue demi-vie soient détruites petit à petit.

Ce n'est cependant pas toujours la première venue des protéines qui passe dans les lysosomes ; en cas de carence alimentaire, par exemple, ceux-ci capturent et détruisent les protéines de manière sélective ; les protéines détruites dans ces conditions contiennent des séquences d'acide aminé approchant la séquence consensus -Lys-Phé-Glu-Arg-Gln-, qui les ciblerait vers le lysosome. Un membre de la famille Hsp70 des chaperons moléculaires intervient dans la destruction lysosomiale de ces protéines, probablement parce qu'il est nécessaire de déployer la chaîne protéique avant son passage à travers la membrane lysosomiale. On pense que les protéines détruites par cette voie sont des protéines non indispensables et à survie prolongée ; en cas de carence alimentaire, la cellule les sacrifie pour se fournir en acides aminés et en énergie, de façon à entretenir certains processus métaboliques de base.

Figure 7.41
Le système lysosomial. Le lysosome renferme divers enzymes digestifs, notamment des protéases. Il capture des protéines cellulaires par fusion avec des autophagosomes, issus d'un enclavement de zones de cytoplasme ou de fragments d'organites (par exemple de mitochondrie) par des régions du réticulum endoplasmique. Cette fusion donne un phagolysosome qui digère le contenu de l'autophagosome.



Résumé

TRADUCTION DES ARNm

TERMES CLÉ : **ARNt, anticodon, aminoacyl-ARNt synthétase**

ARN de transfert : Les ARN de transfert servent d'adaptateurs pour aligner les acides aminés sur la matrice d'ARNm. Les aminoacyl-ARNt synthétases greffent les acides aminés à l'ARNt approprié, qui vient ensuite s'attacher au codon de l'ARNm par appariement de bases complémentaires.

TERMES CLÉ : **ribosome, ARNr**

Le ribosome : Le ribosome se compose de deux éléments, chacun fait de protéines et d'ARN ribosomiaux. L'ARNr 23S est le catalyseur clé de la formation des liaisons peptidiques.

TERMES CLÉ : **région 5' non traduite, polycistronique, monocistronique, région 3' non traduite, séquence de Shine-Delgarno**

Structure des ARNm et amorçage de la traduction : Tant chez les procaryotes que chez les eucaryotes, l'ARNm dicte l'amorçage par une méthionine. Chez les bactéries, les codons d'amorçage sont précédés par une séquence qui aligne l'ARNm sur le ribosome, grâce à l'appariement à son ARNr 16S. Chez les eucaryotes, le ribosome trouve les codons d'amorçage en balayant à partir du bout 5' de l'ARNm, reconnu à sa coiffe de 7-méthylguanosine.

TERMES CLÉ : **facteur d'amorçage, facteur d'allongement, facteur de terminaison, polysome**

Processus de traduction : La traduction débute par la fixation de méthionyl-ARNt et de l'ARNm au petit élément du ribosome. Le grand élément du ribosome vient alors se joindre au complexe et la chaîne polypeptidique grandit jusqu'à ce que le ribosome atteigne un codon de terminaison de l'ARNm. Chez les procaryotes comme chez les eucaryotes, amorçage, allongement et terminaison de la traduction requièrent tout une série de facteurs non ribosomiaux.

Régulation de la traduction : La traduction d'un ARNm déterminé peut être modulée par attachement de répresseurs protéiques ; le degré de traduction globale est réglable par modification des facteurs d'amorçage. La polyadénylation de l'ARNm est aussi un mécanisme important dans la régulation de la traduction chez le jeune embryon.

REPLOIEMENT DES CHAÎNES POLYPEPTIDIQUES ET MATURATION DES PROTÉINES

Chaperons et reploiement des chaînes : En s'attachant aux chaînes polypeptidiques non ou mal reployées et en les stabilisant, les chaperons moléculaires facilitent le reploiement intracellulaire de ces chaînes en leur conformation tridimensionnelle correcte.

chaperon, protéine du choc thermique, chaperonine

Enzymes et reploiement des chaînes polypeptidiques : Deux types d'enzymes au moins, l'isomérase des disulfures protéiques et la peptidy-prolyl isomérase, catalysent le reploiement des chaînes polypeptidiques en rompant et reformant des liaisons covalentes.

isomérase de disulfures protéiques, peptidyl-prolyl isomérase

Clivage des protéines : Une étape importante de la maturation des protéines est la protéolyse. Ainsi les protéines sécrétées et celles incorporées à la plupart des organites d'eucaryote sont étiquetées, selon leur destination, par une [illegible]

protéolyse, séquence signal, peptidase du signal

[illegible]

Attachement à lipides : [illegible]

RÉGULATION DU FONCTIONNEMENT DES PROTÉINES

Régulation par de petites molécules : L'activité de beaucoup de protéines est modulée par attachement de petites molécules, telles que des acides aminés et des nucléotides, qui provoquent des changements de conformation et d'activité des protéines.

Phosphorylation des protéines : Une phosphorylation réversible, qui commande l'activité d'un grand nombre de protéines, est due à l'action de protéine kinases et de protéine phosphatases.

Interactions entre protéines : Les interactions entre chaînes polypeptidiques sont importantes dans la régulation des enzymes allostériques et d'autres protéines cellulaires.

DESTRUCTION DES PROTÉINES

La voie ubiquitine/protéasome : Dans la cellule d'eucaryote, la voie principale de destruction sélective de protéines utilise l'ubiquitine comme étiquette pour envoyer au protéasome les protéines vouées à une destruction rapide.

Protéolyse lysosomiale : Les protéases lysosomiales détruisent les protéines captées par endocytose et sont responsables de la lente destruction des organites cytoplasmiques et des protéines de longue demi-vie. En cas de carence alimentaire, certaines protéines sont véhiculées sélectivement au lysosome pour y être consommées.

QUESTIONNAIRE

1. Vous désirez faire s'exprimer un ADNc cloné d'eucaryote chez une bactérie. Quel type de séquence devez-vous introduire pour que l'ARNm soit traduit sur les ribosomes d'un procaryote ?

2. Quel serait l'influence d'un inhibiteur de poly-adénylation sur la synthèse de protéines dans l'œuf fécondé ?

3. Pourquoi un membre de la famille des chaperons Hsp70 est-il indispensable à la destruction lysosomiale sélective de protéines pendant une carence alimentaire mais pas à la destruction des protéines capturées par autophagie ?

4. Vous désirez étudier une protéine exprimée à la surface des hépatocytes. Expliquez pourquoi un traitement de ces cellules par la phospholipase vous indiquera si votre protéine est transmembranaire ou si elle est ancrée à la surface de la cellule par une ancre GPI ?

5. Vous étudiez un enzyme qui est activable par phosphorylation de son résidu sérine en position 59. Dans quelle mesure une mutation de cette sérine en thréonine modifierait-elle l'activité de l'enzyme ? Quel serait la suite d'une mutation de cette sérine en une alanine ?

POUR EN SAVOIR PLUS

Références générales

Branden, C et Tooze, J. (1991) Introduction à la structure des protéines. Traduction française de l'édition anglaise.1996, De Boeck, Bruxelles.[R]

Hill, W. E., A. Dahlberg, R. A. Garrett, P. B. Moore, D. Schlessinger and J. R.Warner, eds. 1990. *The Ribosome: Structure, Function, and Evolution.* Washington: American Society for Microbiology.

Traduction des ARNm

Charlier, P. *et al.* 1998. Résistance bactérienne aux β-lactamines. *Médecine/Sciences* **14** :544-555.

Chen, J.-J. and I. M. London. 1995. Regulation of protein synthesis by heme-regulated eIF-2α kinase. Trends Biochem. Sci. 20: 105–108. [R]

Crick, F. H. C. 1966. Codon-anticodon pairing: The wobble hypothesis. *J. Mol. Biol.* 19: 548–555. [P]

Curtis, D., R. Lehmann and P. D. Zamore. 1995. Translational regulation in development. *Cell* 81: 171–178. [R]

Gold, L. 1988. Posttranscriptional regulatory mechanisms in *Escherichia coli*. *Ann. Rev. Biochem.* 57: 199–233. [R]

Hershey, J. W. B. 1991. Translational control in mammalian cells. *Ann. Rev. Biochem.* 60: 717–755. [R]

Illangeskare, M., G. Sanchez, T. Nickles and M. Yarus. 1995. Aminoacyl-RNA synthesis catalyzed by an RNA. *Science* 267: 643–647. [P]

Klausner, R. D., T. A. Rouault and J. B. Harford. 1993. Regulating the fate of mRNA: The control of cellular iron metabolism. *Cell* 72: 19–28. [R]

Kozak, M. 1990. The scanning model for translation: An update. *J. Cell Biol.* 108: 229–241. [R]

Kozak, M. 1992. Regulation of translation in eukaryotic systems. *Ann. Rev. Cell Biol.* 8: 197–225. [R]

Merrick, W. C. 1992. Mechanism and regulation of eukaryotic protein synthesis. *Microbiol. Rev.* 56: 291–315. [R]

Noller, H. F. 1991. Ribosomal RNA and translation. *Ann. Rev. Biochem.* 60: 191–227. [R]

Noller, H. F., V. Hoffarth and L. Zimniak. 1992. Unusual resistance of peptidyl transferase to protein extraction procedures. *Science* 256: 1416–1419. [P]

Pause, A., G. J. Belsham, A.-C. Gingras, O. Donze, T.-A. Lin, , J. C. Lawrence Jr., and N. Sonenberg. 1994. Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function. *Nature* 371: 762–767. [P]

Pestova, T. V. et al. 1998. Eukaryotic ribosomes require initiation factors 1 and 1A to locate initiation codons. *Nature* **394** :854-859. [O]

Piccirilli, J. A., T. S. McConnell, A. J. Zaug, H. F. Noller and T. R. Cech. 1992. Aminoacyl esterase activity of the *Tetrahymena* ribozyme. *Science* 256: 1420–1424. [P]

Rhoads, R. E. 1993. Regulation of eukaryotic protein synthesis by initiation factors. *J. Biol. Chem.* 268: 3017–3020. [R]

Rodnina, M. V. *et al.* 1997. Hydrolysis of GTP by elongation factor G drives tRNA movement on the ribosome. *Nature* **385** :37.

Saks, M. E., J. R. Sampson and J. N. Abelson. 1994. The transfer RNA identity problem: A search for rules. *Science* 263: 191–197. [R]

Samaha, R. R., R. Green and H. F. Noller. 1995. A base pair between tRNA and 23S rRNA in the peptidyl transferase centre of the ribosome. *Nature* 377: 309–314. [P]

Stern, S., T. Powers, L.-M. Changchien and H. F. Noller. 1989. RNA-protein interactions in 30S ribosomal subunits: folding and function of 16S rRNA. *Science* 244: 783–790. [P]

Reploiement des chaînes polypeptidiques et remaniement des protéines

Bardwell, J. C. A. and J. Beckwith. 1993. The bonds that tie: Catalyzed disulfide bond formation. *Cell* 74: 769–771. [R]

Braig, K., Z. Otwinowski, R. Hegde, D. C. Boisvert, A. Joachimiak, A. L. Horwich and P. B. Sigler. 1994. The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 Å. *Nature* 371: 578–586. [P]

Casey, P. J. 1995. Protein lipidation in cell signaling. *Science* 268: 221–225. [R]

Clarke, S. 1992. Protein isoprenylation and methylation at carboxy-terminal cysteine residues. *Ann. Rev. Biochem.* 61: 355–386. [R]

Dalbey, R. E. and G. von Heijne. 1992. Signal peptidases in prokaryotes and eukaryotes—a new protease family. *Trends Biochem. Sci.* 17: 474–478. [R]

Ellis, J. R. and S. M. van der Vies. 1991. Molecular chaperones. *Ann. Rev. Biochem.* 60: 321–347. [R]

Englund, P. T. 1993. The structure and biosynthesis of glycosyl phosphatidylinositol protein anchors. *Ann. Rev. Biochem.* 62: 121–138. [R]

Freedman, R. B., T. R. Hirst and M. F. Tuite. 1994. Protein disulphide isomerase: Building bridges in protein folding. *Trends Biochem. Sci.* 19: 331–336. [R]

Gething, M.-J. and J. Sambrook. 1992. Protein folding in the cell. *Nature* 355: 33–45. [R]

Gibbs, J. B., A. Oliff and N. E. Kohl. 1994. Farnesyltransferase inhibitors: Ras research yields a potential cancer therapeutic. *Cell* 77: 175–178. [R]

Gierasch, L. M. 1989. Signal sequences. *Biochemistry* 28: 923–930. [R]

Hart, G. W., R. S. Haltiwanger, G. D. Holt and W. G. Kelly. 1989. Glycosylation in the nucleus and cytoplasm. *Ann. Rev. Biochem.* 58: 841–874. [R]

Hartl, F. U. 1996. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381: 571–580. [R]

Hartl, F. U., R. Hlodan and T. Langer. 1994. Molecular chaperones in protein folding: the art of avoiding sticky situations. *Trends Biochem. Sci.* 19: 20–25. [R]

Hirschberg, C. B. and M. D. Snider. 1987. Topography of glycosylation in the rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Ann. Rev. Biochem.* 56: 63–87. [R]

Johnson, D. R., R. S. Bhatnagar, L. J. Knoll and J. I. Gordon. 1994. Genetic and biochemical studies of protein N-myristoylation. *Ann. Rev. Biochem.* 63: 869–914. [R]

Kornfield, R. and S. Kornfield. 1985. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Ann. Rev. Biochem.* 45: 631–664. [R]

Netzer, W. J. et Hartl, F. U. 1997. Recombination of protein domains facilitatd by co-translational folding in eukaryotes. *Nature* **388** :343.

Rapaport, T. A. 1992. Transport of proteins across the endoplasmic reticulum membrane. *Science* 258: 931–936. [R]

Sanders, S. L. and R. Schekman. 1992. Polypeptide translocation across the endoplasmic reticulum membrane. *J. Biol. Chem.* 267: 13791–13794. [R]

Towler, D. A., J. L. Gordon, S. P. Adams and L. Glaser. 1988. The biology and enzymology of eukaryotic protein acylation. *Ann. Rev. Biochem.* 57: 69–99. [R]

Udenfriend, S. and K. Kodukula. 1995. How glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins are made. *Ann. Rev. Biochem.* 64: 563–591. [R]

Xu, Z. *et al.* 1997. The crystal structure of the assymetric GroEL-GroES-(ADP)$_7$ chaperonin complex. *Nature* **388** :741.

X,Y,Z 1993. Accessory folding proteins. Reviews on prolyl *cis-trans* isomerase, 70-kDa HSR protein, protein disulfide isomerase, *E. coli* SecB protein. *Adv. Prot. Chem.* **44**.

X,Y,Z. 1997. Protein misassembly. *Adv. Prot. Chem.* **50**.

Régulation du fonctionnement des protéines

Charbonneau, H. and N. K. Tonks. 1992. 1002 protein phosphatases? *Ann. Rev. Cell Biol.* 8: 463–493. [R]

Cohen, P. 1989. The structure and regulation of protein phosphatases. *Ann. Rev. Biochem.* 58: 453–508. [R]

Edelman, A. M., D. K. Blumenthal and E. G. Krebs. 1987. Protein serine/threonine kinases. *Ann. Rev. Biochem.* 56: 567–613. [R]

Fischer, E. H. and E. G. Krebs. 1989. Commentary on "The phosphorylase b to a converting enzyme of rabbit skeletal muscle." *Biochim. Biophys. Acta* 1000: 297–301. [R]

Hanks, S. K., A. M. Quinn and T. Hunter. 1988. The protein kinase family: Conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* 241: 42–52. [R]

Hunter, T. 1995. Protein kinases and phosphatases: The yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* 80: 225–236. [R]

Kantrowitz, E. R. and W. N. Lipscomb. 1990. *Escherichia coli* aspartate transcarbamoylase: The molecular basis for a concerted allosteric transition. *Trends. Biochem. Sci.* 15: 53–59. [R]

Milburn, M. V., L. Tong, A. M. DeVos, A. Brunger, Z. Yamaizumi, S. Nishimura and S.-H. Kim. 1990. Molecular switch for signal transduction: structural differences between active and inactive forms of protooncogenic Ras proteins. *Science* 247: 939–945. [P]

Monod, J., J.-P. Changeux and F. Jacob. 1963. Allosteric proteins and cellular control systems. *J. Mol. Biol.* 6: 306–329. [P]

Taylor, S. S., D. R. Knighton, J. Zheng, L. F. R. Eyck and J. M. Sowadski. 1992. Structural framework for the protein kinase family. *Ann. Rev. Cell Biol.* 8: 429–462. [R]

Destruction des protéines

Ciechanover, A. 1994. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell* 79: 13—21. [R]

Deshaies, R. J. 1995. Make it or break it: The role of ubiquitin- dependent proteolysis in cellular regulation. *Trends Cell Biol.* 5: 428–434. [R]

Dice, J. F. 1990. Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. *Trends Biochem. Sci.* 15: 305–309. [R]

Glotzer, M., A. W. Murray and M. W. Kirschner. 1991. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 349: 132–138. [P]

Goldberg, A. L. 1995. Functions of the proteasome. The lysis at the end of the tunnel. *Science* 268: 522–523. [R]

Groll, M. *et al.* 1997. Structure of the 20S proteasome from yeast at 2.4 angström resolution. *Nature* **386** :463.

Jentsch, S. and S. Schlenker. 1995. Selective protein degradation: A journey's end within the proteasome. *Cell* 82: 881–884. [R]

Peters, J.-M. 1994. Proteasomes: Protein degradation machines of the cell. *Trends Biochem. Sci.* 19: 377–382. [R]

Bruce Heinemann, *Leaves, Seattle, Washington*, 1992



3e PARTIE Structure et fonction cellulaires

8 Le noyau

La présence d'un noyau est le trait notoire qui distingue un eucaryote d'un procaryote. En hébergeant le génome cellulaire, le noyau sert à la fois de répertoire de l'information génétique et de poste de commande de la cellule. Réplication et transcription d'ADN ainsi que maturation des ARN s'accomplissent au sein du noyau ; seule l'étape ultime de l'expression des gènes (la traduction) se passe dans le cytoplasme.

En isolant le noyau au sein du cytoplasme, l'enveloppe nucléaire permet à la cellule de réglementer l'expression de ses gènes par des mécanismes propres aux eucaryotes. Alors que les ARNm procaryotiques commencent d'être traduits avant que leur synthèse soit achevée, les ARNm d'eucaryotes subissent des remaniements post-transcriptionnels (par exemple, l'excision-épissage des introns) avant d'être transportés du noyau au cytoplasme ; la présence du noyau donne donc à la cellule le temps d'adapter l'expression de ses gènes dès qu'ils sont transcrits, notamment par excision-épissage des introns. En limitant l'accès des protéines au matériau génétique, l'enveloppe nucléaire permet encore d'ajuster l'expression des gènes au niveau de la transcription ; ainsi l'expression de certains gènes d'eucaryote est-elle asservie au passage, soumis à régulation, des facteurs de transcription du cytoplasme vers le noyau — forme de régulation transcriptionnelle qui manque aux procaryotes. La mise du génome à l'abri du site de traduction des ARNm joue donc un rôle central dans l'expression des gènes d'eucaryotes.

ENVELOPPE NUCLÉAIRE ET TRAFIC NUCLÉOCYTOPLASMIQUE

L'enveloppe nucléaire sépare le contenu du noyau de celui du cytoplasme et soutien la charpente du noyau. Les membranes de l'enveloppe nucléaire, de vraies barrières au passage des molécules, font du noyau un compartiment biochimique distinct ; les seuls accès d'un compartiment à l'autre sont les complexes du pore nucléaire, qui gouvernent l'échange de molécules entre le noyau et le cytoplasme. Le trafic sélectif de protéines et d'ARN à travers les complexes du pore nucléaire non seulement détermine la composition du compartiment nucléaire, mais est aussi le régisseur de l'expression des gènes d'eucaryote.

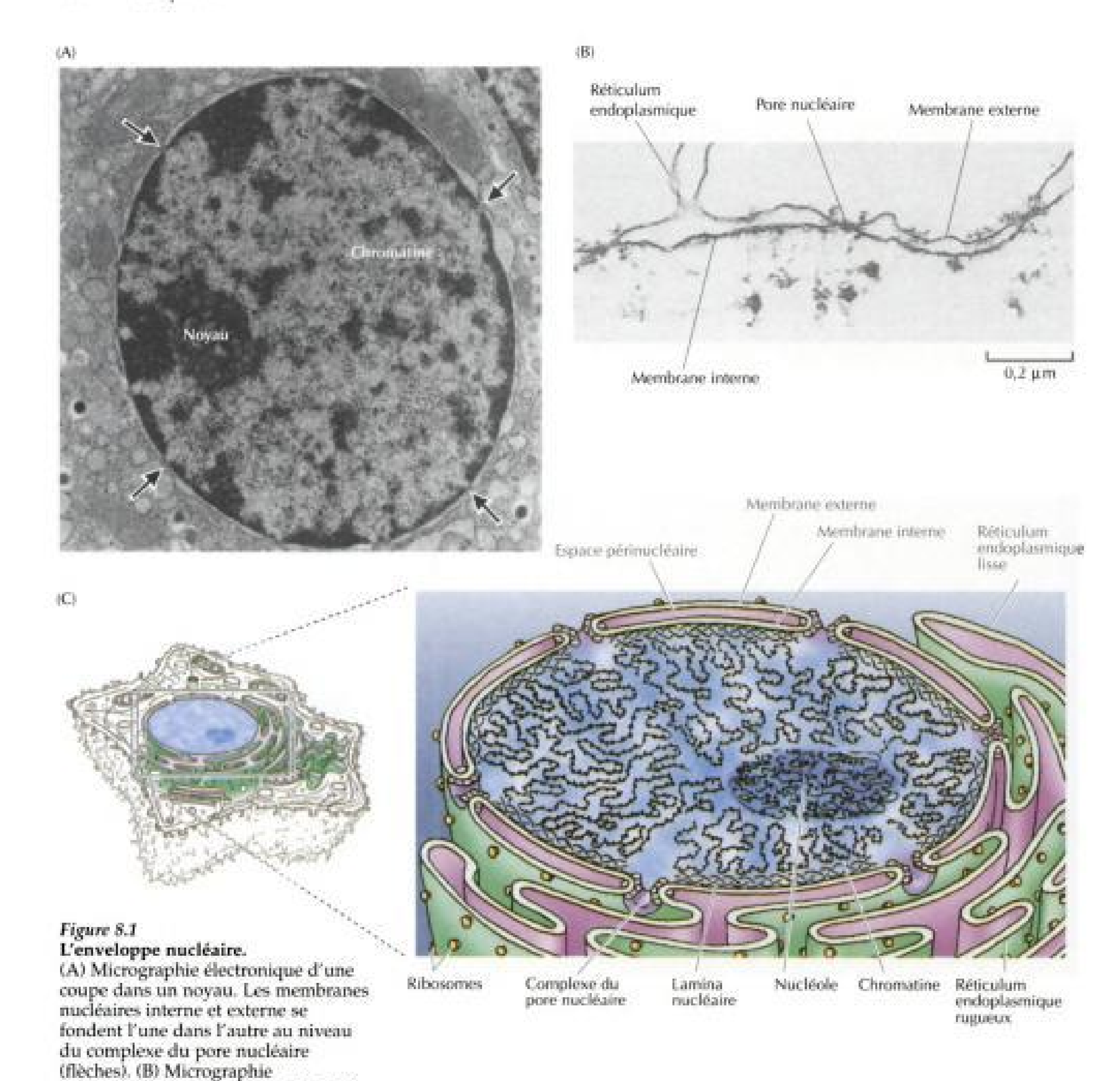


Figure 8.1
L'enveloppe nucléaire.
(A) Micrographie électronique d'une coupe dans un noyau. Les membranes nucléaires interne et externe se fondent l'une dans l'autre au niveau du complexe du pore nucléaire (flèches). (B) Micrographie électronique illustrant la continuité de la membrane nucléaire externe avec le réticulum endoplasmique. (C) Schéma de l'enveloppe nucléaire. La membrane nucléaire interne est soutenue par la lamina nucléaire, qui sert d'attache à la chromatine. (A, David M. Phillips/Photo Researchers, Inc. ; B, aimablement transmis par Larry Gerace, Scripps Research Institute.)

Structure de l'enveloppe nucléaire

L'**enveloppe nucléaire** est une structure complexe, formée des deux membranes nucléaires, d'une lame nucléaire sous-jacente et des complexes du pore nucléaire (figure 8.1). Le noyau est bordé d'un système de deux membranes concentriques, appelées **membranes nucléaires**, interne et externe ; la membrane externe prolonge le réticulum endoplasmique, de sorte que l'espace entre les deux membranes nucléaires est en continuité avec la lumière du réticulum endoplasmique. Les membranes nucléaires portent les enzymes caractéristiques du réticulum endoplasmique et fonctionnent au point de vue biochimique comme celles du réticulum endoplasmique (voir chapitre 9) ; en outre, la face cytoplasmique de la membrane nucléaire externe est pourvue de ribosomes, comme celle du réticulum endoplasmique.

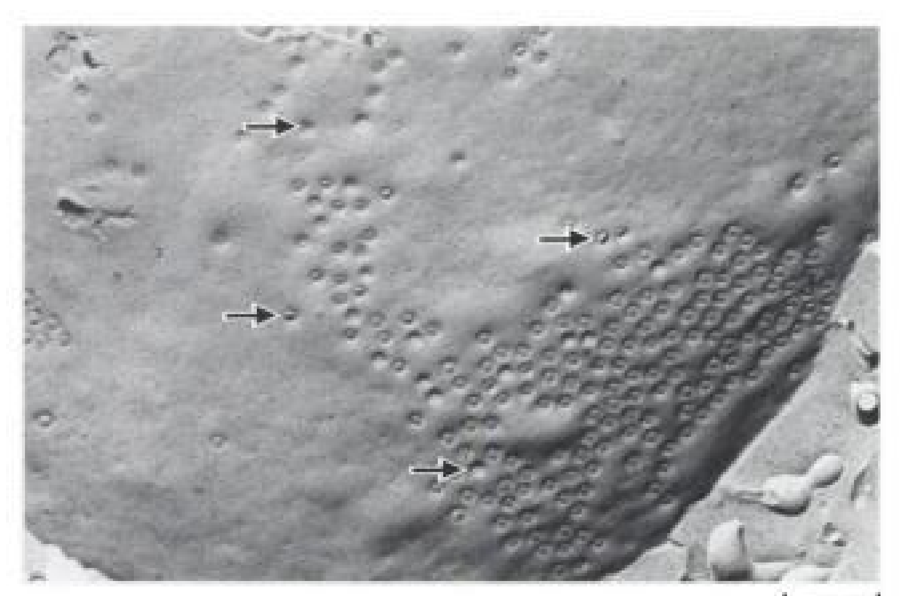


Figure 8.2
Pores nucléaires vus au microscope électronique. De nombreux pores nucléaires (flèches) sont visibles sur cette enveloppe nucléaire traitée par cryo-fracture. (Photo Researchers, Inc.)

Cependant, ce qui est primordial, c'est le fait que les deux membranes nucléaires forment barrière entre les constituants du cytoplasme et ceux du noyau ; comme les autres membranes cellulaires, celles du noyau sont des bicouches phospholipidiques perméables seulement aux petites molécules apolaires (voir figure 2.49) ; les autres molécules ne franchissent pas les bicouches phospholipidiques. Les membranes nucléaires interne et externe se soudent au niveau des complexes du pore nucléaire, seuls tunnels par lesquels les petites molécules polaires et les macromolécules traversent l'enveloppe nucléaire (figure 8.2). Comme on le verra dans la section suivante, le complexe du pore nucléaire est une structure complexe, responsable du trafic sélectif des protéines et des ARN entre noyau et cytoplasme.

Sous la membrane nucléaire interne se trouve la **lamina nucléaire**, trame fibreuse qui sert de charpente au noyau (figure 8.3) ; la lamina nucléaire se compose d'au moins une protéine appelée **lamine**. Les cellules de mammi-

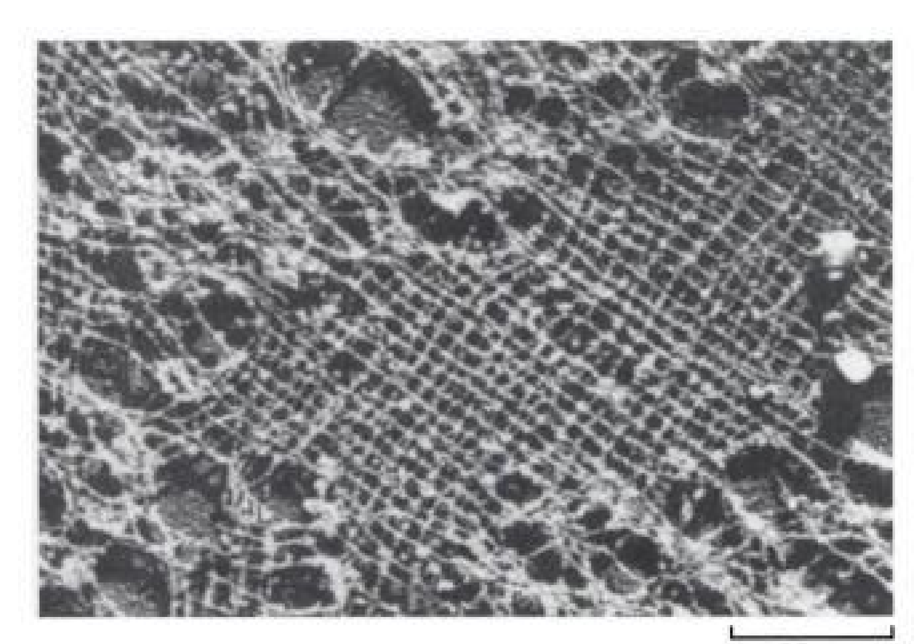


Figure 8.3
Micrographie électronique de la lamina nucléaire. La lamina est un tissu de filaments soutenant la membrane nucléaire interne. (Aimablement transmis par Larry Gerace, Scripps Research Institute.)

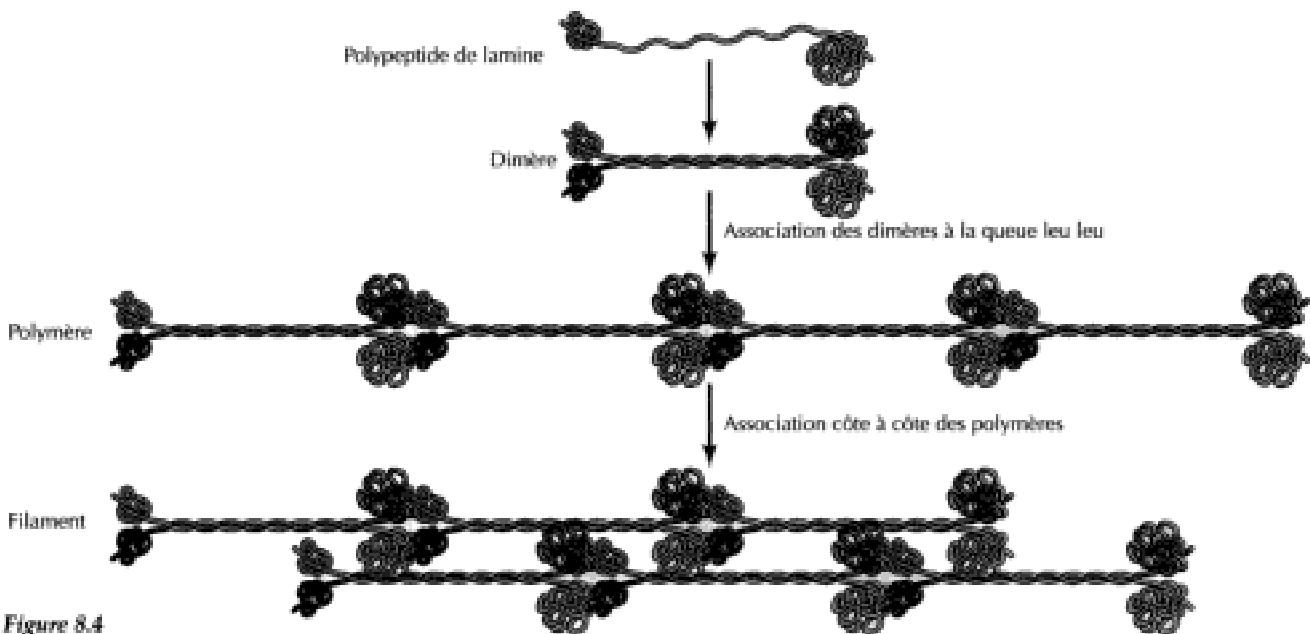


Figure 8.4
Modèle d'assemblage des molécules de lamine. Les polypeptides de lamine forment des dimères par enroulement de la partie médiane α-hélicoïdale d'un des polypeptides autour de celle de l'autre. L'assemblage progresse par association bout à bout de ces dimères en polymères linéaires, puis par agrégation côte à côte de ceux-ci en filaments.

fère, par exemple, possèdent habituellement quatre types de lamine, désignées A, B_1, B_2 et C ; toutes sont des protéines fibreuses de 60 à 80 kilodaltons (kd), apparentées aux protéines constituants les filaments intermédiaires du cytosquelette (voir chapitre 11) ; comme ces dernières, les lamines s'associent en filaments (figure 8.4). Leur association commence par l'accolement de deux molécules en un dimère où la région α-hélicoïdale d'un polypeptide s'enroule autour de la région correspondante de l'autre polypeptide pour former une superhélice ; ces dimères de lamines s'accolent ensuite les uns aux autres pour constituer les filaments de la lamina. En outre, les lamines s'attachent à des protéines membranaires intrinsèques, qui, semble-t-il, arrangent les filaments de lamines en un filet et les arriment à la membrane nucléaire interne. L'ancrage des lamines de type B à cette membrane est d'ailleurs renforcé par greffage post-transcriptionnel d'une chaîne lipidique, notamment par prénylation de résidus cystéines C-terminaux (voir figure 7.30).

Outre qu'elle charpente la structure du noyau, la lamina nucléaire sert, semble-t-il, d'ancrage à la chromatine ; celle-ci forme dans le noyau de grandes boucles d'ADN dont certaines paraissent soudées à l'enveloppe nucléaire ; en s'attachant à la chromatine, les lamines seraient les médiateurs de cette interaction.

Complexe du pore nucléaire

Les **complexes du pore nucléaire** sont les seuls tunnels par où les petites molécules polaires, les ions et les macromolécules vont et viennent du noyau au cytoplasme. Le complexe du pore nucléaire est un très gros ensemble, d'un diamètre d'environ 120 nm et d'une masse moléculaire approximative de 125 millions de daltons, soit 30 fois la taille du ribosome. En réglant le trafic des molécules entre le noyau et le cytoplasme, le complexe du pore nucléaire joue un rôle de premier plan dans la physiologie de la cellule eucaryote. D'une part, les ARN, synthétisés dans le noyau, doivent être exportés activement vers le cytoplasme, là où ils interviennent dans la synthèse des protéines ; d'autre part, les protéines indispensables au fonctionnement du noyau (comme les facteurs de transcription) doivent quitter les ribosomes

cytoplasmiques pour gagner le noyau. Ce trafic bien réglé de protéines et d'ARN à travers le complexe du pore nucléaire dicte la composition du noyau et est la clé de l'expression des gènes.

Les molécules traversent un pore nucléaire de deux façons (figure 8.5), selon qu'elles sont petites ou grandes. Les petites molécules (de moins de 20 kd, à peu près) traversent facilement l'enveloppe nucléaire dans les deux sens, du cytoplasme au noyau ou l'inverse, par diffusion passive au travers du tunnel aqueux ménagé dans le complexe du pore nucléaire ; d'après la taille des molécules ainsi échangées, on estime que le tunnel a un diamètre d'environ 10 nm. Bien entendu, la plupart des protéines et des ARN sont plus gros que l'ouverture des tunnels et ne passent pas d'eux mêmes à travers l'enveloppe nucléaire, mais franchissent le complexe du pore nucléaire par un processus actif dans lequel chaque sorte de protéine ou d'ARN est transportée dans un seul sens (noyau vers cytoplasme ou l'inverse). Ces molécules empruntent des tunnels en forme de diaphragme réglable, sur commande de signaux appropriés, jusqu'à une valeur d'au moins 25 nm, suffisante pour admettre les grands complexes ribonucléoprotéiques, comme les éléments du ribosome. C'est par ces tunnels réglables que les protéines nucléaires sont sélectivement importées du cytoplasme au noyau et que les ARN sont exportés du noyau vers le cytoplasme.

Quand on observe les complexes du pore nucléaire au microscope électronique, on remarque une symétrie octogonale creusée d'un large tunnel central (figure 8.6), chemin par où les protéines et les ARN traversent l'enveloppe nucléaire. Des études approfondies, notamment par interprétation d'images à l'ordinateur, ont permis de construire un modèle tridimensionnel du complexe du pore nucléaire (figure 8.7) ; c'est un assemblage de huit

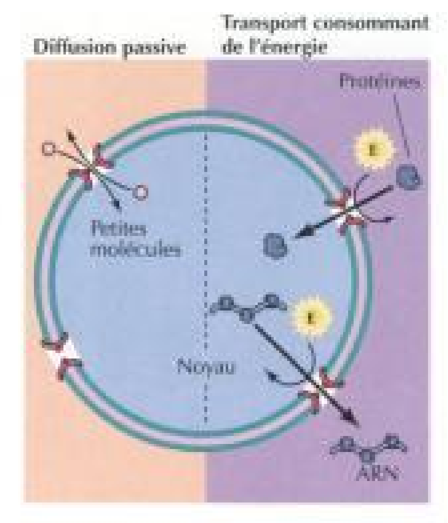


Figure 8.5
Trafic de molécules à travers le complexe du pore nucléaire.
Les petites molécules traversent rapidement par diffusion les tunnels ouverts d'un complexe du pore nucléaire. Par contre, les macromolécules sont transportées par un mécanisme sélectif, consommateu[r]
gie, dont le rôle essentie[l]

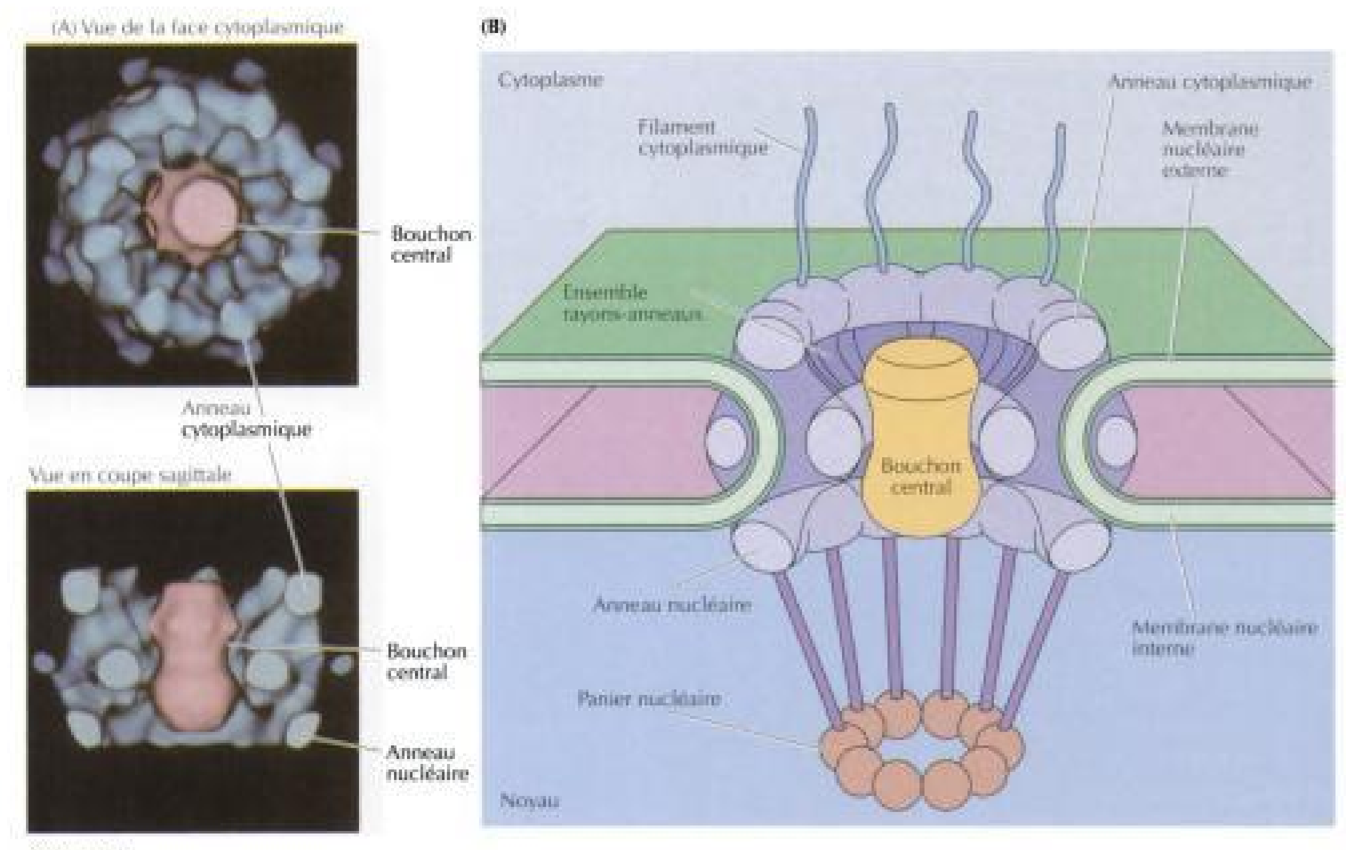


Figure 8.7
Modèle de complexe du pore nucléaire. (A) Vue par la face et en coupe sagittale d'un complexe du pore nucléaire d'après les images de microscopie électronique après cryofracture. L'ensemble rayons et anneaux est coloré en bleu, le bouchon central en rose. (B) Dessin d'un complexe du pore nucléaire ; l'ensemble de huit rayons réunis par un anneau sur les faces cytoplasmique et nucléaire de l'enveloppe nucléaire ménage un tunnel central occupé ici par un bouchon. Des filaments cytoplasmiques sont greffés à l'anneau cytoplasmique et des filaments faisant saillie sur l'anneau nucléaire rejoignent le panier nucléaire. (A, d'après C. W. Akey et M. Radermacher, 1993, *J. Cell Biol.* **122** :1.)

miques, des filaments protéiques forment, du côté cytoplasmique, une structure en panier bien visible.

Le tunnel central ménagé dans l'ensemble rayon-anneaux a un diamètre d'environ 40 nm, taille suffisante pour admettre les plus grosses particules qui traversent de fait l'enveloppe nucléaire. Parfois, le tunnel central contient un bouchon central, structure dont on ignore la nature ; selon certains auteurs, il ferait partie intégrante du complexe du pore nucléaire et contrôlerait le passage des molécules à travers le tunnel, pour d'autres, ce bouchon ne ferait pas partie intégrante du complexe, mais représenterait des macromolécules en train de franchir le tunnel central.

À part le grand tunnel central, l'examen minutieux des complexes du pore nucléaire montra que l'ensemble des rayons et des anneaux ménage entre les rayons huit fins tunnels d'environ 10 nm de diamètre, qui seraient les tunnels ouverts à la diffusion des petites molécules. Ainsi les petites molécules soumises à la diffusion et les macromolécules transportées sélectivement emprunteraient des pertuis distincts du complexe du pore nucléaire.

On commence seulement à saisir la structure et le fonctionnement des composants du complexe du pore nucléaire à l'échelle moléculaire. À en juger par sa taille, le complexe du pore nucléaire comprendrait une centaine au moins de protéines différentes, dont on n'a identifié qu'une minorité ; on devra chercher les mécanismes par lesquels les composants du complexe du pore nucléaire transbordent sélectivement les molécules d'un côté à l'autre de l'enveloppe nucléaire.

Importation sélective de protéines dans le noyau

C'est pour les protéines importées du cytoplasme au noyau qu'on saisit le mieux le principe du transport sélectif à travers l'enveloppe nucléaire ; ces [redacted]

EXPÉRIENCE CLÉ



Identification d'un signal de localisation nucléaire

A Short Aminoacid Sequence Able to Specify Nuclear Location

Daniel Kalderon, Bruce L. Roberts, William D. Richardson, and Alan E. Smith
National Institute for Medical R

de localisation au noyau. Kalderon et ses collaborateurs mirent cette hypothèse à l'épreuve en imaginant deux approches expérimentales.

Identification d'un signal de localisation nucléaire (suite)

dées à des protéines typiquement cytoplasmiques. Les résultats de ces expériences établirent qu'il suffisait de greffer la séquence 127-132 de l'antigène T soit à la β-galactosidase, soit à la pyruvate kinase, par exemple, pour entraîner l'accumulation dans le noyau de protéines normalement cytoplasmiques (voir figure). Cette courte séquence d'acides aminés de l'antigène T de SV40 agit donc comme signal de localisation au noyau, nécessaire et suffisant pour dicter la destination nucléaire de ces protéines.

Portée de la découverte

Comme le suggéraient Kalderon et ses collègues dans leur publication de 1984, le signal de localisation nucléaire de l'antigène T de SV40 « serait le prototype de séquences semblables trouvées dans d'autres protéines nucléaires ». En dictant l'importation d'une protéine au noyau, ces signaux sont d'une importance primordiale, car ils garantissent l'intégrité biochimique du noyau et perpétuent la distinction fondamentale entre compartiment cytoplasmique et compartiment nucléaire, qui caractérise la cellule eucaryotique. On sait à présent que les signaux de localisation au noyau sont reconnus par des récepteurs cytoplasmiques qui convoient leurs substrats protéiques jusqu'au complexe du pore nucléaire. Bien qu'on doive encore élucider les mécanisme de transport à travers ce complexe, l'identification des signaux de localisation nucléaire fut un grand pas en avant dans notre conception de l'importation des protéines nucléaires.



Alan Smith

La deuxième phase de l'importation au noyau, le passage dans la lumière du pore, exige de l'énergie, sous forme d'ATP et de GTP ; c'est liée à son substrat protéique que l'importine α serait transférée le long du pore nucléaire, pendant que l'importine β se dissocie. Une des protéines indispensables à la translocation est une petite protéine fixant GTP, appelé Ran, apparentée aux protéines Ras (voir figure 7.35). Ran provoquerait la dissociation des

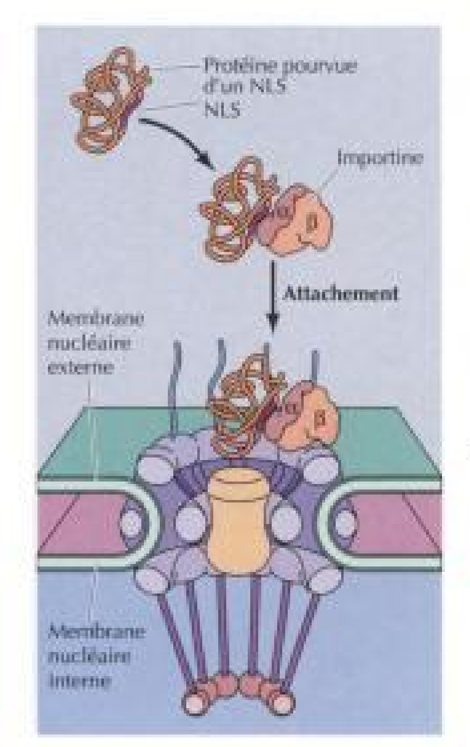
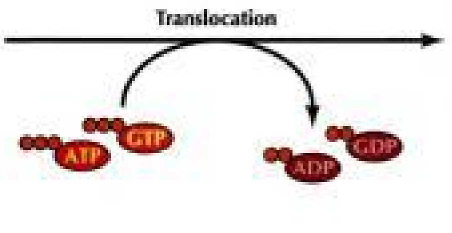
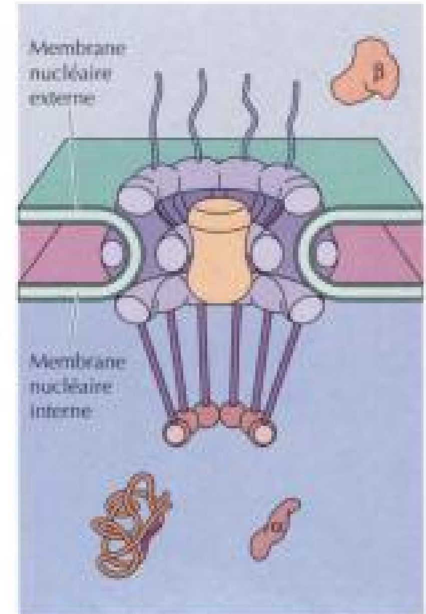


Figure 8.9
Importation d'une protéine par le complexe du pore nucléaire.
Les protéines sont transportées au delà du pore nucléaire en deux étapes. Une protéine pourvue d'une séquence de localisation au noyau (NLS) est d'abord reconnue, puis transportée vers le complexe du pore nucléaire par un récepteur cytoplasmique (l'importine) ; la protéine et le protomère α de l'importine sont ensuite poussés à travers le complexe du pore nucléaire au cours d'une phase ultérieure, dans un processus qui consomme de l'énergie.





protomères d'importine, mais on ignore encore à peu près tout du mécanisme d'importation par le complexe du pore nucléaire.

Une fois entrées dans le noyau, certaines protéines ne le quittent plus, d'autres font la navette entre le noyau et le cytoplasme ; certaines de ces protéines navette fonctionnent comme porteurs d'autres molécules, notamment d'ARN, d'autres asservissent le fonctionnement du noyau à celui du cytoplasme (en modulant l'activité des facteurs de transcription). On a récemment identifié des séquences d'acides aminés particulières, signaux d'exportation, qui commandent le passage rapide de certaines protéines navette du noyau au cytoplasme. Il semble que ces signaux de retour au cytoplasme sont reconnus, comme le sont ceux d'importation, par des récepteurs intranucléaires qui canalisent le transfert des protéines navette à travers le complexe du pore nucléaire.

Régulation de l'importation de protéines nucléaires

Un aspect captivant de l'importation des protéines au noyau est le fait qu'elle constitue encore un niveau auquel l'activité des protéines nucléaires est ajustée. Ainsi, les facteurs de transcription n'agissant que dans le noyau, toute modulation de leur importation au noyau est encore une manette de commande de l'expression des gènes. Comme nous le montrerons au chapitre 13, la régulation de l'importation de facteurs de transcription et de protéine kinases dans le noyau est la base des adaptations de la cellule aux modifications du milieu, car c'est le moyen dont dispose la cellule pour faire parvenir à son noyau les signaux reçus à sa surface.

Un mécanisme de régulation bien connu est celui dans lequel des facteurs de transcription (ou d'autres protéines) s'associent à des protéines cytoplasmiques qui masquent leurs séquences de localisation nucléaire ; ces signaux sont ainsi ignorés et leurs porteurs ne sortent pas du cytoplasme. C'est le cas du facteur de transcription NF-κB qui stimule la transcription des chaînes légères κ d'immunoglobulines dans les lymphocytes B (figure 8.10). Dans les cellules au repos, NF-κB est inactif, car il est associé à une protéine cytoplasmique inhibitrice (IκB) qui masque son signal de localisation nucléaire et empêche qu'il ne soit véhiculé au noyau. Quand le lymphocyte B a été stimulé, IκB est phosphorylé, ubiquitinylé, puis détruit par protéolyse ; NF-κB peut alors gagner le noyau et activer la transcription de ses gènes cible.

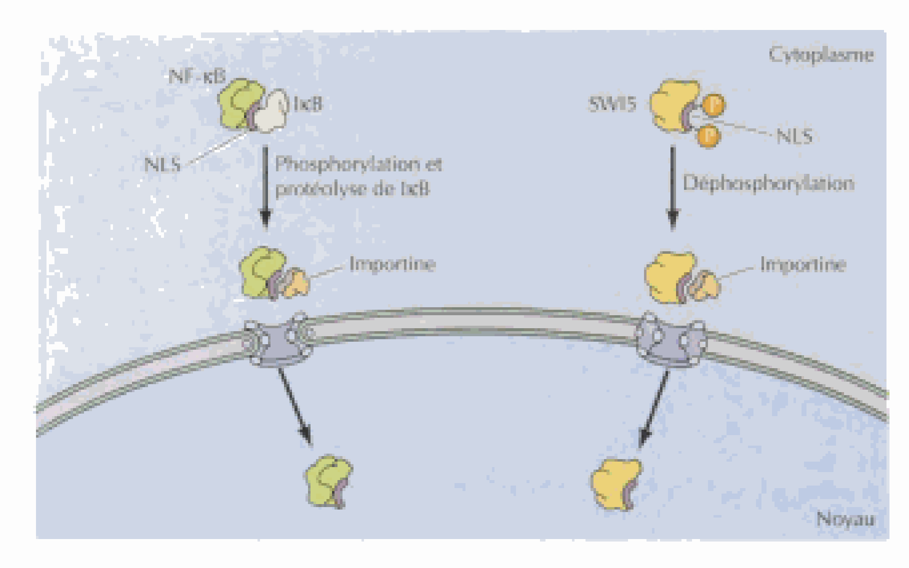


Figure 8.10
Régulation de l'importation des facteurs de transcription dans le noyau. Le facteur de transcription NF-κB est maintenu sous forme inerte dans un complexe avec IκB qui masque sa séquence de localisation au noyau (NLS). S'il arrive des signaux extracellulaires appropriés, IκB est phosphorylé et détruit par protéolyse, ce qui cause l'entrée de NF-κB dans le noyau. Par contre, le facteur de transcription SW15 de la levure reste dans le cytoplasme grâce à une phosphorylation de résidus voisins de sa séquence de localisation au noyau ; au stade approprié du cycle cellulaire, une déphosphorylation sur commande démasque la séquence de localisation de SW15 et celui-ci est transporté au noyau.

Le transport au noyau d'autres facteurs de transcription n'est pas commandé par association à une protéine inhibitrice, mais par phosphorylation directe ; c'est le cas de SW15, un facteur de transcription qui rejoint le noyau de la levure à un moment précis du cycle cellulaire (voir figure 8.10) ; aux autres moments, SW15 reste dans le cytoplasme, car il est phosphorylé sur des résidus sérine voisins du signal de localisation nucléaire, ce qui empêche son transfert au noyau. Une déphosphorylation sur commande de ces sites, au moment opportun du cycle cellulaire, active SW15 et provoque sa translocation au noyau.

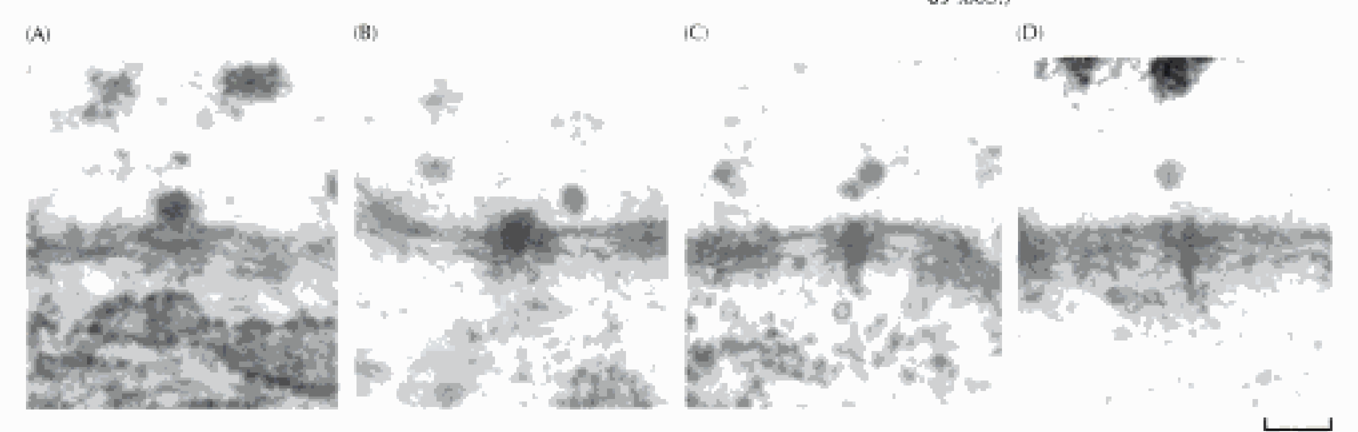
Transport des ARN

Si maintes protéines sont transportées du cytoplasme au noyau, la plupart des ARN sont exportés du noyau vers le cytoplasme. Comme les protéines sont synthétisées dans le cytoplasme, l'exportation des ARNm, ARNr et ARNt est une étape maîtresse de l'expression des gènes dans les cellules d'eucaryote. Comme l'importation des protéines, le passage des ARN à travers le complexe du pore nucléaire est un processus énergétiquement défavorisé qui exige une protéine Ran chargée de GTP. Le mécanisme d'exportation des ARN est cependant moins bien connu que le mécanisme d'importation des protéines au noyau.

Les ARN traversent l'enveloppe nucléaire sous forme de complexes ARN-protéine, parfois suffisamment volumineux pour qu'on puisse les voir au microscope électronique (figure 8.11). Comme les substrats du transport sont non des ARN nus, mais des complexes ribonucléoprotéiques, le signal qui commande leur exportation peut siéger sur l'ARN lui-même ou sur la protéine à laquelle il est associé. Les pré-ARNm et les ARNm sont attachés à une série d'au moins 20 protéines (pour former les **ribonucléoprotéines nucléaires hétérogènes**, ou **RNPnh**), pendant le temps nécessaire à leur maturation dans le noyau et à leur futur passage au cytoplasme. L'une au moins des protéines de ces RNPnh est une protéine navette pourvue d'un signal d'exportation hors du noyau et capable de véhiculer un ARNm durant son passage au cytoplasme. Comme on le verra plus loin dans ce chapitre, les ARN ribosomiaux s'associent avec les protéines ribosomiales au sein du nucléole et ce sont les éléments complets du ribosome qui sont transférés au cytoplasme ; il semble que leur sortie du noyau soient due à des signaux présents sur les protéines ribosomiales. Quant aux ARNt, on ignore quels signaux ou quelles protéines spécifiques gouvernent leur importation dans le cytoplasme.

Contrairement aux ARNm, ARNt et ARNr, qui exercent leur fonction dans le cytoplasme, les petits ARN nucléaires (ARNpn) composant la machinerie de maturation des ARN l'exercent dans le noyau ; on sera surpris d'apprendre que ces ARN passent d'abord au cytoplasme, où ils s'associent à des

Figure 8.11
Transport d'un complexe ribonucléoprotéique. Les cellules de la glande salivaire des insectes produisent de grands complexes ribonucléoprotéiques RNP, contenant des ARN de 35 à 40 kb et dont la masse totale approche les 30 millions de daltons. Cette série de micrographies électroniques montre l'attachement d'une de ces RNP à un complexe du pore nucléaire (A) et le déploiement de l'ARN au moment de sa translocation dans le cytoplasme (B-D). (D'après H. Mehlin *et al*. 1992, *Cell* **69** :605.)



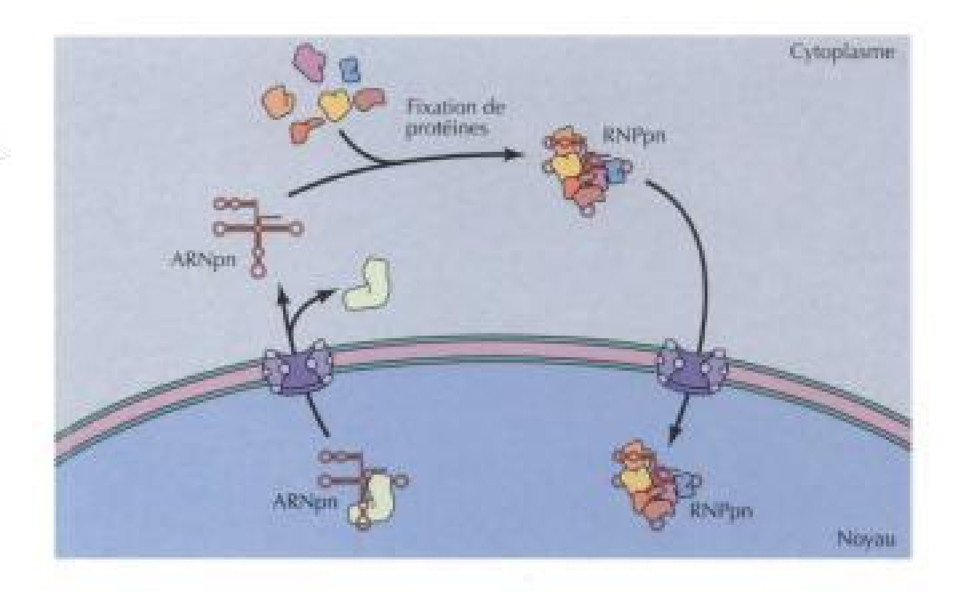


Figure 8.12
Va-et-vient des ARNpn entre noyau et cytoplasme. Les petits ARN nucléaires passent d'abord du noyau au cytoplasme, où ils s'associent à des protéines en formant les RNPpn ; ces dernières sont ensuite transportées dans le noyau.

protéines pour former des RNPpn fonctionnelles ramenées ensuite au noyau (figure 8.12). Des protéines qui se fixent à la coiffe 5′ de certains ARNm interviendraient dans l'exportation de ces RNPpn vers le cytoplasme, alors que des séquences portées par les protéines des RNPpn assureraient le transfert de ces RNPpn du cytoplasme au noyau.

STRUCTURE INTERNE DU NOYAU

Le noyau n'a rien d'un réservoir où chromatine, molécules d'ARN et protéines nucléaires diffusent librement dans une solution aqueuse ; il possède une infrastructure qui arrange le matériau génétique et confine certaines fonctions nucléaires dans des zones bien distinctes. La structure intranucléaire la plus reconnaissable est le nucléole ; comme on le verra dans la section suivante, c'est là que sont transcrits les gènes d'ARNr et que sont assemblés les éléments du ribosome. D'autres éléments de structure existent dans le noyau, comme le suggèrent la forme des chromosomes et le confinement potentiel de fonctions telles que la réplication d'ADN et la maturation des pré-ARNm dans certaines zones bien déterminées du noyau.

Chromosomes et superstructure de la chromatine

La chromatine achève de se condenser au cours de la mitose pour former les chromosomes compacts que se partagent les cellules filles (voir figure 4.12). Durant l'interphase, une partie de la chromatine (**hétérochromatine**) reste très condensée et est réfractaire à la transcription ; le reste de la chromatine (**euchromatine**) est décondensé et dispersé dans tout le noyau (figure 8.13). La cellule comporte deux types d'hétérochromatine. L'hétérochromatine constitutive contient des séquences d'ADN qui ne sont jamais transcrites, comme les séquences satellites siégeant dans les centromères ; l'hétérochromatine facultative contient des séquences non transcrites dans la cellule que l'on observe, mais qui sont transcrites dans d'autres types de cellules. Le taux d'hétérochromatine facultative varie donc selon l'activité transcriptionnelle de la cellule considérée.

Le phénomène connu sous le nom d'**inactivation du chromosome** X est un exemple du rôle joué par l'hétérochromatine dans l'expression des gènes. Chez beaucoup d'animaux, l'Homme compris, la femelle possède deux chromosomes X, le mâle un chromosome X et un chromosome Y. Le chromosome X porte des milliers de gènes dont est dépourvu le chromosome Y, de plus petite taille (voir figure 4.30). La femelle possède donc deux fois plus de gènes du chromosome X que le mâle, mais, en dépit de cette différence,

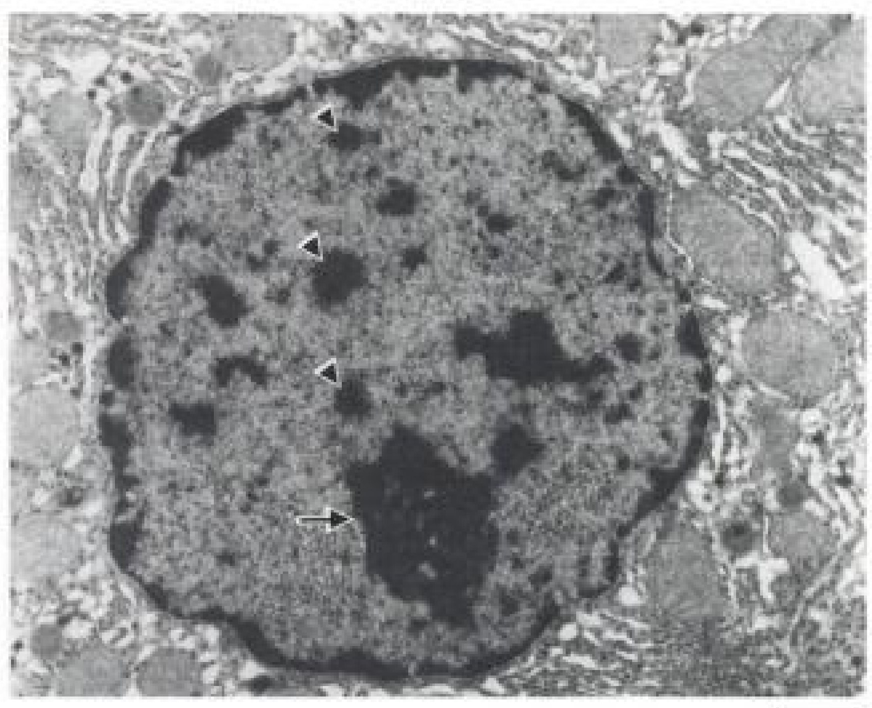


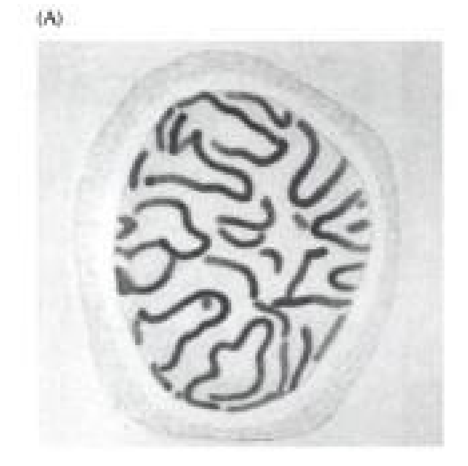
Figure 8.13
Hétérochromatine d'un noyau en interphase. Il existe de l'euchromatine dans tout le noyau. L'hétérochromatine est indiquée par des pointes de flèche et le nucléole par une flèche. (Aimablement transmis par Ada L. Olins & Donald E. Olins, Oak Ridge National Laboratory.)

mâle et femelle possèdent des quantités égales de protéines codées par les gènes du chromosome X. Ceci provient d'un mécanisme de compensation dans lequel un des deux chromosomes X s'inactive par condensation en hétérochromatine au début du développement de l'embryon femelle ; comme chez le mâle, seul un exemplaire du chromosome X est disponible pour la transcription chez la femelle.

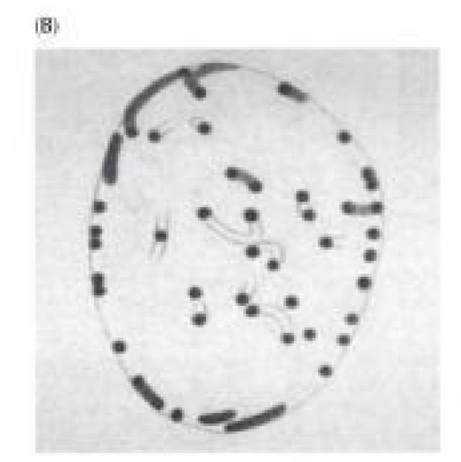
Bien que la chromatine paraisse répartie de façon uniforme pendant l'interphase, les chromosomes sont en fait arrangés de façon particulière et partagés en domaines fonctionnels discrets qui jouent un rôle important dans la régulation de l'expression des gènes. Le fait que la chromatine n'est pas dispersée au hasard dans le noyau interphasique fut suggéré en 1885 par C. Rabl ; il pensait que chaque chromosome occupait un territoire propre du noyau, ses centromères et télomères étant arrimés à des pôles opposés de l'enveloppe nucléaire (figure 8.14). Près d'un siècle plus tard (en 1984), on confirma ce modèle fondamental de l'infrastructure du chromosome en observant les chromosomes polytènes de la glande salivaire de *Drosophila* ; ceux-ci n'étaient pas enchevêtrés les uns autour des autres, mais siégeaient chacun dans une région particulière du noyau (figure 8.15). Les chromosomes sont étroitement associés à l'enveloppe nucléaire en de nombreux endroits, avec leur centromère d'un côté, et leurs télomères de l'autre ; chaque chromosome de la cellule de mammifère occupe aussi un territoire distinct du noyau, quoique, dans certaines cellules, la position du centromère et des télomères ne se conforme pas au dessin de Rabl.

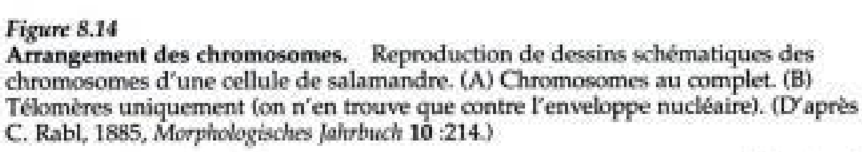
Comme l'ADN des chromosomes métaphasiques (voir figure 4.13), la chromatine du noyau interphasique apparaît disposée en domaines en forme de boucle comprenant environ de 50 à 100 kb d'ADN. Un bel exemple de

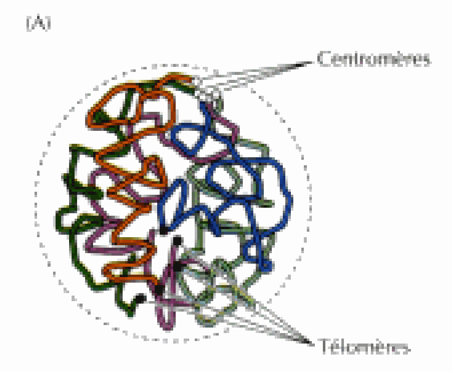
(A)



(B)




Figure 8.14
Arrangement des chromosomes. Reproduction de dessins schématiques des chromosomes d'une cellule de salamandre. (A) Chromosomes au complet. (B) Télomères uniquement (on n'en trouve que contre l'enveloppe nucléaire). (D'après C. Rabl, 1885, *Morphologisches Jahrbuch* **10** :214.)



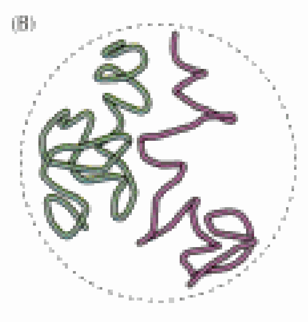


Figure 8.15
Arrangement des chromosomes de *Drosophila*. (A) Modèle de noyau, montrant les cinq bras chromosomiques colorés différemment ; on a indiqué la position des télomères et celle des centromères. (B) Les deux bras du chromosome 3 montrent la séparation topologique des chromosomes. (D'après D. Mathog *et al.* 1984, *Nature* **308** :414.)

cet arrangement en domaine est celui des chromosomes de l'ovule des amphibiens, où les grandes boucles de chromatine décondensée que l'on observe correspondent à des régions d'ADN sujette à une activité transcriptionnelle intense (figure 8.16) ; on pense que ces zones de chromatine sont des unités fonctionnelles discrètes, dont l'expression génique est commandée de façon indépendante.

L'influence qu'a l'organisation interne d'un chromosome sur l'expression de ses gènes a été élucidée au moyen d'une série d'expériences montrant que la position d'un gène donné sur l'ADN chromosomique influençait le niveau auquel le gène s'exprimait. L'activité transcriptionnelle de gènes introduit dans des souris transgéniques, par exemple, dépend de l'endroit du génome de souris où ces gènes sont insérés. On arrive à annuler cet effet de position en dotant ces gènes de **régions de commande du locus**, qui feront s'exprimer le gène à grande vitesse quel que soit son site d'intégration au chromosome. Contrairement aux amplificateurs de transcription (voir chapitre 6), les régions de commande du locus ne stimulent que les gènes intégrés à l'ADN du chromosome ; elles sont sans effet sur l'expression de l'ADN des plasmides non intégrés au cours des expériences d'expression transitoire. En outre, les régions de commande du locus n'influencent pas chaque promoteur en particulier, mais agissent sur de vastes domaines chromosomiques, probablement parce qu'elles provoquent des remaniements de grande envergure dans la structure de la chromatine.

Ces domaines chromosomiques sont séparés par des **éléments frontière**, qui empêchent la structure chromatinienne d'un domaine d'empiéter sur celle de ses voisins. De plus, des séquences baptisées **isolateurs**, servent de barrière pour empêcher que les amplificateurs siégeant dans un domaine n'aillent stimuler les promoteurs d'un domaine adjacent. Comme les régions de commande de locus, ces isolateurs fonctionnent uniquement en tant que parties d'un ADN chromosomique, suggérant qu'elles ne jouent que sur une structure chromatinienne d'ordre supérieur ou gouvernent l'association des domaines chromatiniens avec d'autres composants du noyau. Bien qu'on connaisse encore mal le mécanisme d'action des régions de commande de locus ainsi que celle des isolateurs, leur fonction laisse entrevoir l'importance des ordres supérieurs d'organisation structurelle de la chromatine dans la régulation de l'expression des gènes d'eucaryote.

Domaines fonctionnels au sein du noyau

L'hétérogénéité spatiale du noyau est également suggérée par le confinement de certains processus nucléaires à des régions singulières du noyau. La répli-

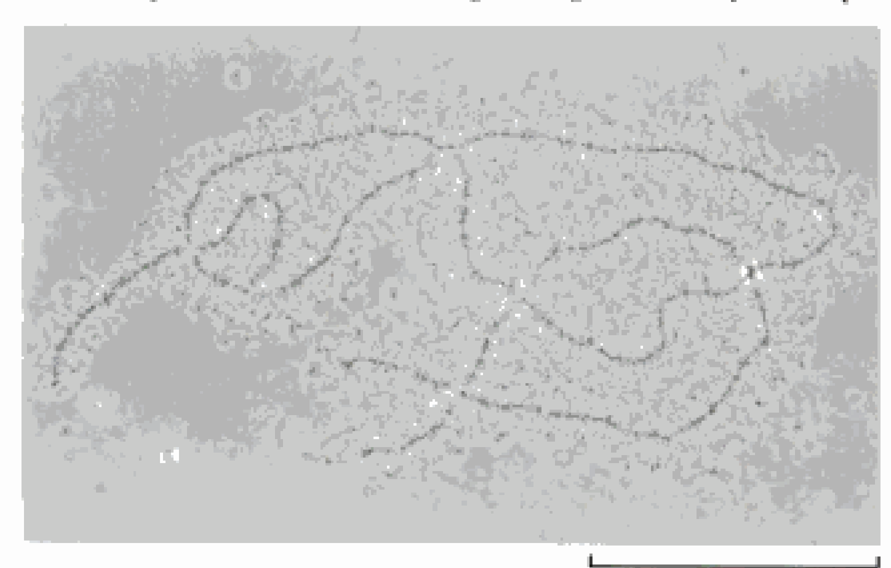


Figure 8.16
Domaines en boucles de la chromatine. Micrographie optique d'un chromosome d'ovocyte d'amphibien ; on voit des boucles décondensées de chromatine activement transcrite greffées sur un axe de chromatine très condensée et non transcrite. (Aimablement transmis par Joseph Gall, Yale University.)

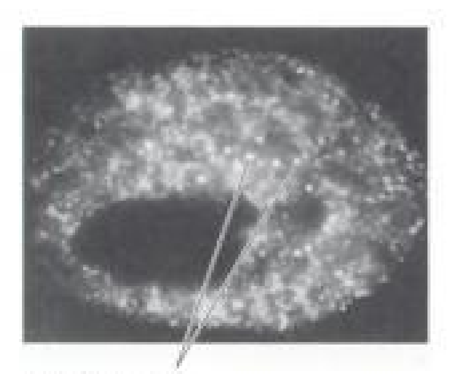


Figure 8.17
Plages bien délimitées où l'ADN se réplique On a marqué l'ADN naissant par une brève incubation des cellules en présence de bromodésoxyuridine, qui prend la place de la désoxythymidine dans l'ADN. Cette substitution permet de voir l'ADN néoformé par immunofluorescence, après coloration par un anticorps dressé contre la bromodésoxyuridine. Remarquez que l'ADN néoformé est présent dans des plages discrètes distribuées dans tout le noyau. (Aimablement transmis par Ronald Berezney, SUNY, Buffalo).

cation de l'ADN, le remaniement des ARN et leur transport se dérouleraient dans des substructures ou des domaines particuliers du noyau, mais on ignore la nature et le rôle de ces structures ; la répartition des divers domaines fonctionnels au sein du noyau est un objet de recherche encore mal exploité par les biologistes cellulaires.

Il semble que le noyau des cellules de mammifère contienne des zones de réplication bien circonscrites, où un grand nombre de molécules d'ADN se répliquent ; on a mis ces zones de réplication en évidence par des expériences dans lesquelles on observait l'ADN néoformé au sein des noyaux cellulaires (figure 8.17). Pour ce faire, on marqua des cellules avec de la bromodésoxyuridine, un analogue de la thymine, qui s'incorpore à l'ADN et qu'on retrouve à l'aide d'anticorps fluorescents ; dans ce type d'expérience, l'ADN néoformé apparaît sous forme d'environ 200 amas discrets répartis dans tout le volume du noyau. Comme il existe à tout moment près de 4 000 origines de réplication actives dans une cellule diploïde de mammifère, chacun de ces centres de réplication d'ADN bien individualisé doit contenir à peu près 200 fourches de réplication. La réplication de l'ADN s'effectuerait donc dans de vastes structures qui comportent de nombreux complexes de réplication, groupés en domaines fonctionnels distincts appelés usines de réplication.

Les gènes rapidement transcrits paraissent occuper tout le noyau, mais en étudiant l'organisation de la machinerie d'excision-épissage et le siège des ARNm, on a constaté que le remaniement des pré-ARNm et le transport des ARNm vers les complexes du pore nucléaire se passent aussi dans des domaines possédant une infrastructure. On a déterminé la place occupée dans le noyau par les composants de la machinerie d'excision-épissage en colorant les préparations par des anticorps (fluorescents) dirigés contre les RNPpn et les facteurs d'excision-épissage (figure 8.18). Loin d'être disséminés uniformément dans le noyau, ces composants se trouvent concentrés dans 20 à 50 structures bien visibles appelées mouchetures nucléaires. Vu ce confinement des composants de la machinerie d'excision-épissage, on a pensé que ces taches correspondaient à des compartiments nucléaires distincts où seraient remanié les pré-ARNm ; certains chercheurs ont suggéré cependant que ces taches seraient non des sites de remaniement actif des pré-ARNm, mais plutôt des sites où les composants de la machinerie d'excision-épissage seraient mis en réserve ; ce concept semble confirmé par le fait qu'au moins une partie des pré-ARNm subit l'excision-épissage au site même de leur transcription, qui ne correspond pas aux taches. On connaît peu de chose encore de la nature des taches et de la disposition intranucléaire des domaines capables d'effectuer l'excision-épissage.

Le fait de pouvoir localiser les transcrits de tel ou tel gène par hybridation *in situ* est une autre preuve que le remaniement des pré-ARNm, la trans-

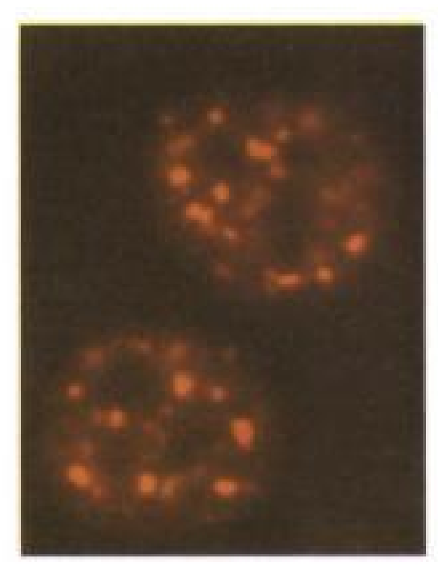


Figure 8.18
Localisation de la machinerie d'excision-épissage. La coloration par des anticorps fluorescents indique que les facteurs d'excision-épissage sont confinés à des domaines discrets du noyau. (Aimablement transmis par David L. Spector, Cold Spring Harbor Laboratory.)

cessus fondamentaux s'opèrent au sein du noyau, de longues recherches sont nécessaires.

La matrice nucléaire

Certains biologistes pensent que l'un des éléments clé de l'infrastructure du noyau est la **matrice nucléaire**, définie comme étant la charpente du noyau. Ce concept fut proposé en 1975 et s'appuie sur des expériences où l'on traitait des noyaux par l'ADNase pour en éliminer la plus grande part de l'ADN puis par des tampons contenant des sels concentrés pour en extraire les histones et les autres protéines nucléaires ; ce traitement laissait subsister un squelette qui maintenait la forme et la taille originelles du noyau (figure 8.20). Ce réseau de matériau insoluble contenait trois substances, la lamina nucléaire, une structure nucléolaire résiduelle et un réseau interne de fibres granuleuses (la matrice nucléaire).

La signification d'une matrice nucléaire mise en évidence de cette manière est très controversée. Ceux qui sont en sa faveur pensent qu'elle sert de charpente interne pour le noyau, à l'égal du cytosquelette pour le cytoplasme ; en outre, on a proposé que la matrice nucléaire arrange et stabilise les domaines fonctionnels du noyau, tels que les boucles de chromatine, les foyers de réplication d'ADN, les centres d'excision-épissage et les structures en jeu dans le transport des ARNm.

Nombreux cependant sont les biologistes qui doutent de l'existence d'une matrice nucléaire dans la cellule vivante ; la matrice observée après traitement des noyaux par la méthode décrite ci-dessus serait le résultat d'une agrégation artificielle de protéines et d'acides nucléiques subie par le noyau lors du traitement. Bien que la matrice nucléaire apparaisse après extraction des noyaux par diverses méthodes, on n'a pas défini clairement sa composition moléculaire ; sans critères d'identification de ses composants structuraux, la matrice nucléaire reste une pomme de discorde parmi les biologistes cellulaires.

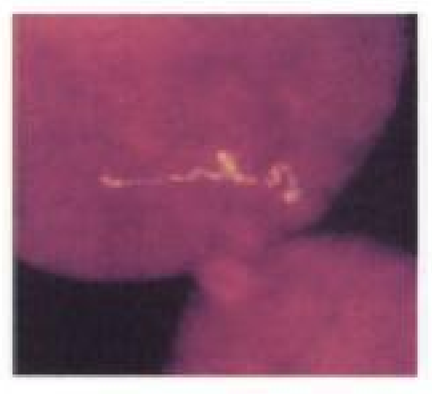


Figure 8.19
Traînées d'ARN. À une préparation de noyaux, on hybride une sonde reconnaissant un ARNm donné et on la reconnaît à sa fluorescence jaune-vert. La fluorescence générale rouge correspond à l'ADN. Les transcrits particuliers sont localisés à des traînées bien définies. (D'après J. B. Lawrence *et al.*, 1989, *Cell* **57** :493.)

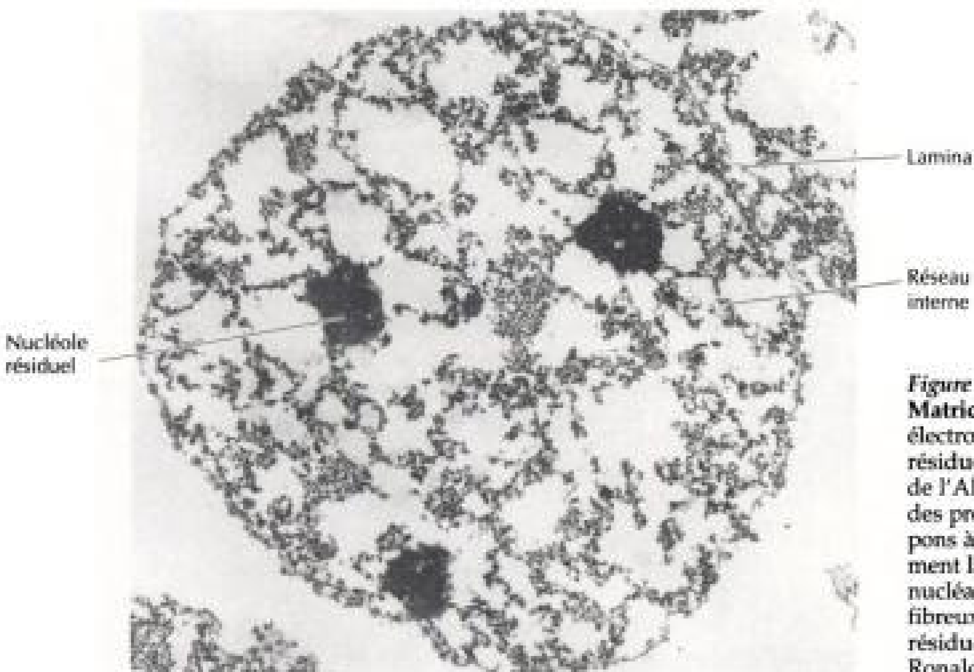


Figure 8.20
Matrice nucléaire. Micrographie électronique montrant la charpente résiduelle d'un noyau après digestion de l'ADN par l'ADNase et extraction des protéines solubles par des tampons à haute teneur en sels. Ce traitement laisse subsister une lamina nucléaire, un nucléole et un réseau fibreux interne (la matrice nucléaire) résiduels. (Aimablement transmis par Ronald Beresney, SUNY, Buffalo.)

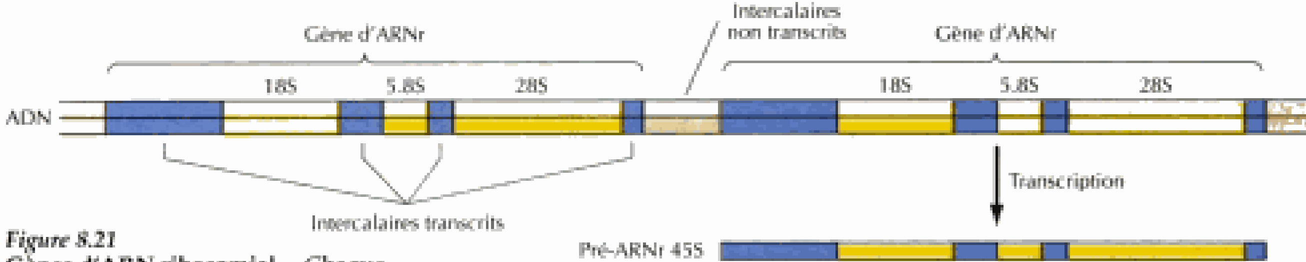


Figure 8.21
Gènes d'ARN ribosomial. Chaque gène d'ARNr est une seule unité de transcription comportant les ARNr 18S, 5,8S et 28S, ainsi que des intercalaires transcrits. Les gènes d'ARNr se suivent à la queue leu leu, séparés par des intercalaires non transcrits.

LE NUCLÉOLE

La structure la plus frappante dans le noyau est le **nucléole** (voir figure 8.1), siège de la transcription et de la maturation des ARNr ainsi que de l'assemblage du ribosome. Comme on l'a montré au chapitre précédent, seul un nombre élevé de ribosomes permet à la cellule d'effectuer la synthèse de ses protéines ; ainsi, toute cellule de mammifère en pleine prolifération dispose de 5 à 10 millions de ribosomes, qui doivent être synthétisés chaque fois que la cellule se divise. Le nucléole est une « ligne » d'assemblage de ribosomes, prête à produire une énorme quantité d'ARNr et à assembler les composants des éléments du ribosome.

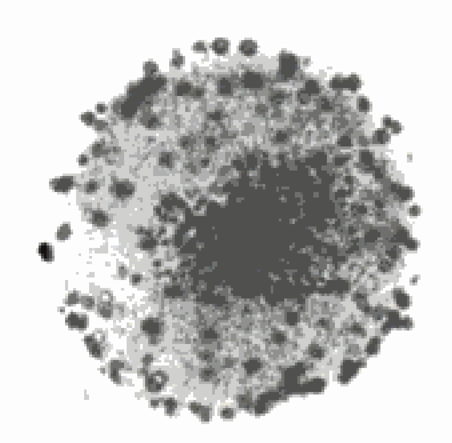
Gènes d'ARN ribosomiaux et organisation du nucléole

Le nucléole, dépourvu de membrane, est organisé autour des régions chromosomiques qui comportent les gènes des ARNr 5,8S, 18S et 28S. Le ribosome d'eucaryote comporte quatre types d'ARN, appelés 5S, 5,8S, 18S et 28S (voir figure 7.4) ; les ARNr 5,8S, 18S et 28S sont produits ensemble dans le nucléole par l'ARN polymérase I, pour donner un ARN ribosomial précurseur de 45S (figure 8.21). Ce pré-ARNr de 45S est scindé pour donner l'ARN 18S du petit élément ribosomial (40S) et les ARNr 5,8S et 28S de son grand élément (60S). La transcription de l'ARNr 5S, qui fait aussi partie de l'élément 60S, a lieu en dehors du nucléole et est catalysée par l'ARN polymérase III.

C'est grâce à ses nombreux exemplaires de gènes d'ARNr que la cellule est capable de produire un si grand nombre de molécules d'ARNr ; le génome humain, par exemple, possède environ 200 exemplaires du gène qui code les ARNr 5,8S, 18S et 28S et environ 2.000 exemplaires du gène qui code l'ARNr 5S. Les gènes des ARNr 5,8S, 18S et 28S sont groupés l'un derrière l'autre en amas qui siègent sur 5 chromosomes différents de l'Homme, à savoir les numéros 13, 14, 15, 21 et 22 ; les gènes d'ARNr 5S sont groupés en un seul amas qui siège sur le chromosome 1.

L'importance de la production de ribosomes est frappante dans l'ovocyte, là où les gènes d'ARNr sont amplifiés pour satisfaire à la synthèse du nombre énorme de ribosomes utilisés au début du développement de l'embryon. Dans l'ovocyte du xénope, les gènes d'ARNr sont amplifiés près de 2.000 fois, ce qui donne environ 1 million d'exemplaires par cellule ; ces gènes d'ARNr amplifiés sont répartis dans des milliers de nucléoles (figure 8.22), ce qui explique l'accumulation de près de 10^{12} ribosomes par ovocyte.

Figure 8.22
Nucléoles dans un ovocyte d'amphibien. Les gènes d'ARNr amplifiés de l'ovocyte de xénope sont groupés au sein d'une multitude de nucléoles (taches noires). (D'après D. D. Brown & I. B. Dawid, 1968, *Science* **160** :272.)



Un nucléole présente à l'observateur trois régions distinctes : un centre fibrillaire, un composant fibrillaire dense et un composant granuleux (figure 8.23). On pense que ces régions sont le siège des processus de transcription et de maturation des ARNr, ainsi que du processus d'assemblage du ribosome ; les gènes d'ARNr siègent dans le centre fibrillaire et le composant fibrillaire dense du nucléole et y sont transcrits, bien qu'on ignore laquelle, parmi ces régions, est le site de la transcription. La maturation des pré-ARNr et leur assemblage avec les protéines commence dans le compo-

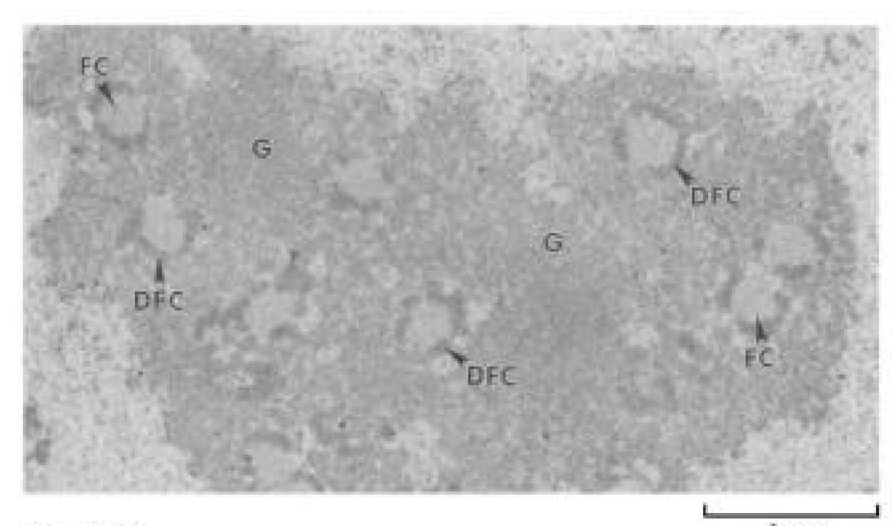


Figure 8.23
Structure du nucléole. Micrographie électronique montrant le centre fibrillaire (FC), le composant fibrillaire dense (DFC) et le composant granulaire (G) d'un nucléole. (Aimablement transmis par David L. Spector, Cold Spring Harbor Laboratory.)

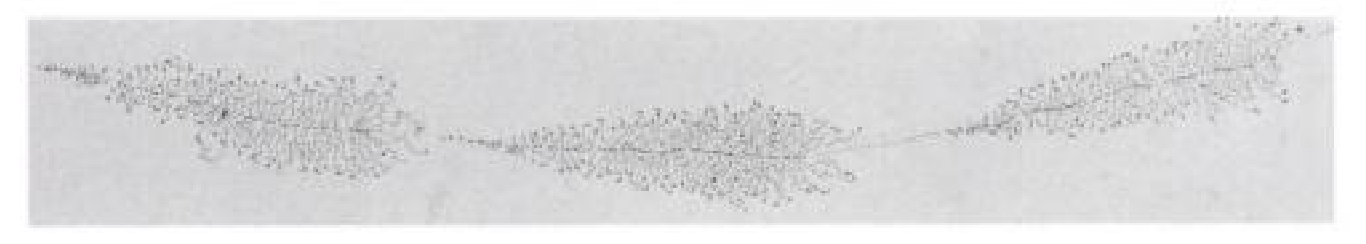
sant fibrillaire dense et se poursuit dans le composant granuleux, qui contient les éléments préribosomiaux presque achevés, prêts à être transportés dans le cytoplasme.

Après chaque division cellulaire, les nucléoles se forment autour des régions portant les gènes d'ARNr 5,8S, 18S et 28S, qu'on appelle, pour cette raison, l'**organisateur nucléolaire**. La formation d'un nucléole n'a lieu qu'après la transcription du pré-ARNr 45S, qui semble amorcer la fusion de corpuscules prénucléolaires pourvus des facteurs de remaniement et d'autres composants du nucléole ; dans la plupart des cellules, les nucléoles, d'abord épars, fusionnent en un seul nucléole. La taille d'un nucléole dépend de l'activité métabolique de la cellule, les plus volumineux étant visibles dans les cellules qui sont en pleine synthèse protéique ; cette différence de taille est due surtout au composant granuleux, site de production des ribosomes.

Transcription et maturation des ARNr

Chaque organisateur nucléolaire comporte un amas de gènes d'ARNr qui se suivent en enfilade, séparés les uns des autres par de l'ADN intercalaire non transcrit. Ces gènes sont transcrits à grande vitesse par l'ARN polymérase I, ce que l'on observe facilement au microscope électronique (figure 8.24) : chaque élément de la suite de gènes d'ARNr est entouré de chaînes naissantes d'ARN serrées les unes contre les autres, faisant penser à un sapin de Noël. La densité élevée des chaînes d'ARN révèle celle des molécules d'ARN polymérase, présentes à la densité maximale d'environ une par centaine de paires de bases de matrice d'ADN.

Figure 8.24
Transcription de gènes d'ARNr. Micrographie électronique de chromatine nucléolaire, montrant trois gènes d'ARNr séparés par un intercalaire d'ADN non transcrit. Sur chaque gène d'ARNr fait saillie une multitude de chaînes naissantes d'ARN, faisant penser à un arbre de Noël. (Aimablement communiqué par O. L. Miller, Jr.)



Le transcrit primaire de gènes d'ARNr est le grand pré-ARNr 45S, qui contient les ARNr 5,8S, 18S et 28S, plus les intercalaires transcrits (figure 8.25) ; on trouve des intercalaires externes transcrits aux deux bouts, 5' et 3', du pré-ARNr ainsi que deux intercalaires internes transcrits entre les séquences d'ARNr 18S, 5,8S et 28S. Tout au début de la transcription, la maturation commence par une coupure dans l'intercalaire externe voisin du bout 5' du pré-ARNr ; ce clivage exige la RNPpn U3 (voir plus loin) qui reste fixée au bout 5' du pré-ARNr, formant les boutons caractéristiques de la figure 8.24. Une fois la transcription terminée, l'intercalaire transcrit du bout 3' est élagué. Dans les cellules humaines, l'étape suivante est une coupure au bout 5' de la région 5,8S, qui donne le précurseur d'ARNr 18S et celui qui est commun aux ARNr 5,8S et 28S ; d'autres scissions aboutissent ensuite aux ARNr matures. La maturation est du même type dans les autres espèces, malgré quelques différences dans l'ordre dans lequel se suivent les diverses étapes.

Outre les découpes, la maturation d'un pré-ARNr met en jeu maintes modifications de nucléotides, à savoir des méthylations de certaines bases et résidus ribosyle ainsi que la conversion de certaines uridines en pseudo-uridines (voir figure 6.38). Dans les cellules animales, la maturation d'un pré-ARNr implique la méthylation d'une centaine de résidus ribosyle et d'une dizaine de bases environ, sans oublier la formation d'environ une centaine de résidus pseudo-uridine. La plupart de ces modifications ont lieu pendant la synthèse de la chaîne de pré-ARNr ou peu après, bien que quelques-unes se passent à un stade ultérieur de la maturation.

La maturation d'un pré-ARNr exige l'intervention de protéines et d'ARN occupant le nucléole. Au chapitre 6, nous avons parlé du rôle joué par les petits ARN nucléaires (ARNpn) dans l'excision-épissage des pré-ARNm ; cinq ARNpn (U1, U2, U4, U5 et U6) sont engagés en tant que composants de la particule d'épissage dans la maturation des pré-ARNm (voir figure 6.43). Parmi les autres espèces d'ARNpn, on en trouve beaucoup dans le nucléole, où il interviendraient dans la maturation des pré-ARNr. Le nombre total de petits ARN nucléolaires irait de 50 à 100, mais la plupart d'entre eux n'ont pas été caractérisés et le rôle de quelques-uns seulement est connu (tableau 8.1). Le plus abondant des ARNpn est U3, présent à environ 200 000 exemplaires par cellule ; comme on l'a dit, U3 est indispensable à la scission

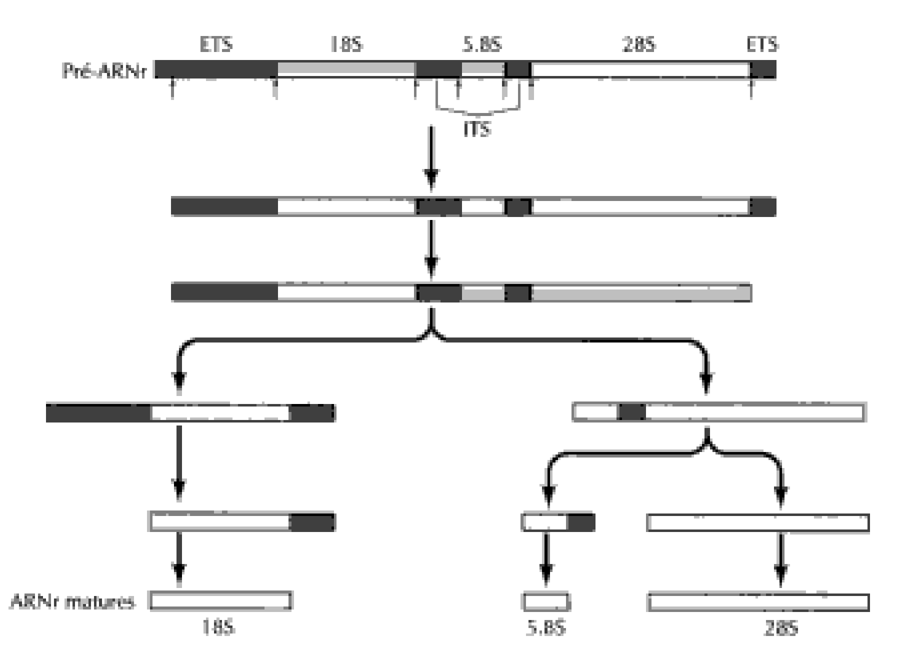


Figure 8.25
Maturation d'un pré-ARNr. Le transcrit de pré-ARNr 45S est flanqué d'intercalaires transcrits (ETS) et comporte des intercalaires internes transcrits (ITS) séparant les uns des autres les ARNr 18S, 5,8S et 28S. Le pré-ARNr subit une série de coupures (illustré ici avec le pré-ARNr humain) qui aboutit aux ARNr matures.

Tableau 8.1 Exemples d'ARNpn nucléolaires

ARNpn	Taille[1]	Fonction
U3	206-228	Remaniement initial du pré-ARNr 45S
U8	136-140	Maturation des ARNr 5,8S et 28S
U14	86-96	Maturation de l'ARNr 18S
U22	125	Maturation de l'ARNr 18S
MRP	260-280	Maturation de l'ARNr 5,8S

[1] Les tailles sont en nombre de bases ; elles valent pour les ARNpn de cellules animales et végétales.

initiale du pré-ARNr dans les séquences intercalées de son bout 5′ et serait nécessaire aussi à d'autres étapes de maturation d'un pré-ARNr. Un autre ARNpn nucléolaire est U8, indispensable au clivage tant en amont de l'ARNr 5,8S qu'au bout 3′ de l'ARNr 28S. La maturation de l'ARNr 18S exige deux autres ARNpn nucléolaires, à savoir U14 et U22 ; le clivage en amont de l'ARNr 5,8S requiert un ARNpn appelé MRP, apparenté au ribozyme ARNase P en jeu dans la maturation des ARNt (voir figure 6.38).

Quoique certains ARNpn nucléolaires (notamment U3 et U8) soient transcrits normalement, beaucoup d'ARNpn nucléolaires sont codés dans des introns de gènes codant une protéine ; l'ARNpn U14, par exemple, est codé dans une région siégeant dans l'intron du gène de la protéine du choc thermique Hsc70. On pense que ce sont des endonucléases qui libèrent ces ARNpn des introns excisés du pré-ARNm qui les hébergeait. Comme c'est le cas des ARNpn de la particule d'épissage, les ARNpn nucléolaires sont associés à des protéines pour former des RNPpn. Il semble que chaque RNPpn nucléolaire consiste en un seul ARNpn associé à un ensemble allant de huit à dix protéines ; chaque RNPpn rejoint ensuite le pré-ARNr pour former un complexe de maturation, processus qui rappelle la formation de la particule d'excision-épissage au contact d'un pré-ARNm.

Bien que le découpage des pré-ARNr soit une fonction primordiale de certains RNPpn nucléolaires, d'autres RNPpn joueraient un rôle supplémentaire dans les remaniements des pré-ARNr et dans l'assemblage des éléments du ribosome. La plupart des ARNpn nucléolaires contiennent de courtes séquences complémentaires aux ARNr 18S et 28S. Par leurs interactions avec les pré-ARNr, les ARNpn nucléolaires serviraient de chaperons ARN tout au long de la maturation des pré-ARNr et de l'assemblage des ribosomes ; les ARNpn nucléolaires joueraient un rôle clé dans le reploiement des pré-ARNr, dans les modifications de bases, dans la fixation de protéines ribosomiales, ainsi que dans l'exportation vers le cytoplasme des éléments du ribosome complétés. Il reste à prouver la nature et la portée de la participation de ces ARNpn nucléolaires dans ces étapes d'assemblage du ribosome.

Assemblage du ribosome

La formation du ribosome résulte de l'association des précurseurs d'ARN ribosomiaux avec les protéines ribosomiales et l'ARNr 5S (figure 8.26). Les gènes codant les protéines ribosomiales sont transcrits en dehors du nucléole par l'ARN polymérase II, en donnant des ARNm traduits sur des ribosomes cytoplasmiques ; les protéines formées sont ensuite transportées du cytoplasme au noyau pour s'associer aux ARNr et former des particules préribosomiales. Quoique les gènes d'ARNr 5S soient transcrits aussi en dehors du nucléole, mais cette fois par l'ARN polymérase III, les ARNr 5S se joignent aux particules préribosomiales au sein du nucléole.

Les protéines ribosomiales commencent à s'attacher à l'ARNr avant que la chaîne de pré-ARNr soit complètement synthétisée et plus de la moitié

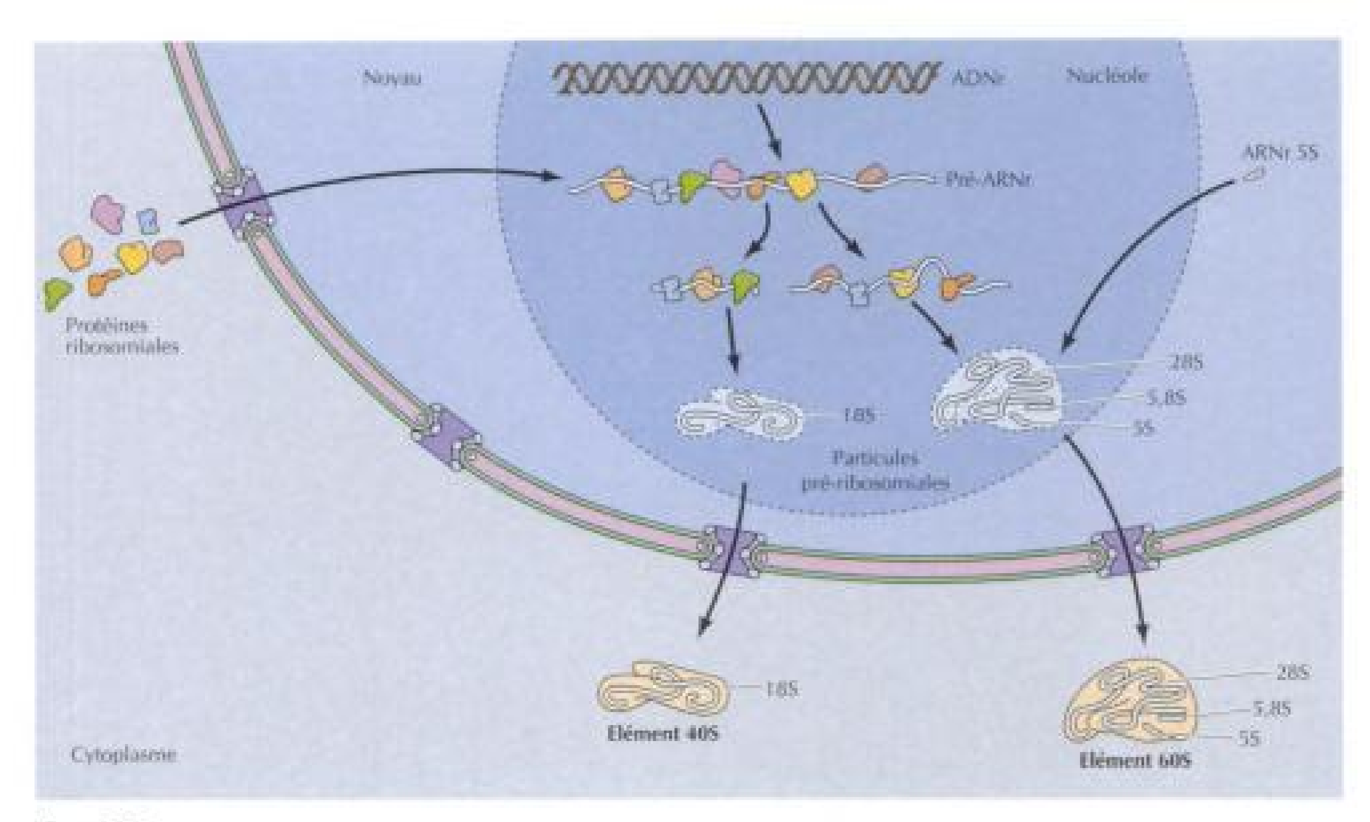


Figure 8.26
Assemblage du ribosome. Les protéines ribosomiales sont importées du cytoplasme au nucléole et commencent à s'assembler sur le pré-ARNr quand il est encore entier. À mesure qu'il est remanié, il est rejoint par d'autres protéines ribosomiales et par l'ARNr 5,8S (synthétisé ailleurs dans le noyau), pour donner les particules pré-ribosomiales. La maturation s'achève par le passage de ces particules pré-ribosomiales au cytoplasme, pour donner les éléments ribosomiaux 40S et 60S.

de ces protéines sont fixées au pré-ARNr avant son découpage. Les autres protéines ribosomiales et l'ARNr 5S s'incorporent aux particules pré-ribosomiales durant les découpages du pré-ARNr. Le petit élément du ribosome, pourvu seulement de l'ARNr 18S arrive plus vite à maturité que le gros élément, pourvu des ARNr 28S, 5,8S et 5S ; aussi les particules pré-ribosomiales d'un nucléole sont-elles en majorité des précurseurs du gros élément. La maturation du ribosome s'achève par l'exportation des particules pré-ribosomiales au cytoplasme, particules qui donneront l'élément 40S et l'élément 60S du ribosome d'eucaryote.

Lors de la formation des ribosomes, de nombreuses molécules font la navette entre le cytoplasme et le noyau. Pour assembler 10 millions de ribosomes en 20 heures (période mise habituellement par une cellule de mammifère en pleine prolifération pour se reproduire), le noyau doit importer au moins 500 millions de molécules de protéines ribosomiales, soit près de 10.000 par seconde, à travers ses complexes du pore nucléaire ; les éléments pré-ribosomiaux assemblés doivent ensuite passer du noyau au cytoplasme. On a observé que plusieurs importantes protéines nucléolaires faisaient rapidement la navette entre le cytoplasme et le nucléole ; ces protéines navette serviraient de porteurs, soit lors de l'importation de protéines ribosomiales vers le noyau, soit pendant l'exportation des éléments ribosomiaux vers le cytoplasme.

LE NOYAU EN COURS DE MITOSE

Un trait propre au noyau est le fait qu'il se démembre et se reforme chaque fois que la cellule se divise. Au début de la mitose, les chromosomes se condensent, le nucléole disparaît et l'enveloppe nucléaire se désagrège, en libérant la plupart des constituants nucléaires dans le cytoplasme. À la fin de la mitose, se produit le processus inverse ; les chromosomes de décondensent et l'enveloppe nucléaire se reforme autour d'un jeu séparé de chro-

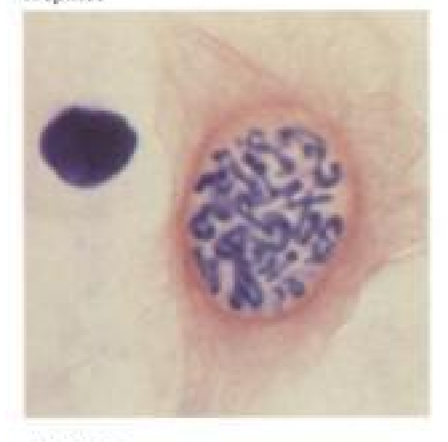
mosomes fils. La mitose sera exposée en détail au chapitre 14 ; abordons seulement ici les mécanismes qui concernent le démembrement et la reconstitution du noyau. Ce processus est gouverné en grande partie par phosphorylation et déphosphorylation réversibles de certaines protéines nucléaires, sous l'effet de la protéine kinase **Cdc2,** un régulateur clé de la mitose dans toutes les cellules d'eucaryote.

Démembrement de l'enveloppe nucléaire

Dans la plupart des cellules, le démembrement de l'enveloppe nucléaire coïncide avec la fin de la prophase mitotique (figure 8.27), mais ce démembrement n'est pas un trait universel de la mitose : on ne l'observe pas dans toutes les cellules. Certains eucaryotes unicellulaires, telles les levures, subissent une mitose, dite fermée, car l'enveloppe nucléaire reste intacte (figure 8.28) ; dans ce type de mitose, les chromosomes fils gagnent les pôles opposés du noyau, qui se clive alors en deux. Les cellules des eucaryotes supérieurs, par contre, subissent une mitose ouverte, caractérisée par un démembrement de l'enveloppe nucléaire ; leur chromosomes fils gagnent ensuite les pôles opposés de l'appareil mitotique et autour d'eux se constituent les nouveaux noyaux.

Le démembrement de l'enveloppe nucléaire, parallèle à la désintégration du réticulum endoplasmique, résulte de modifications frappant ses trois composants : les membranes nucléaires se disloquent en vésicules, les complexes du pore nucléaire se dissocient et la lamina nucléaire se dépolymérise. Parmi ces événements, celui qu'on saisit le mieux est la dépolymérisation de la lamina nucléaire, le tissu de filaments qui soutient la membrane

Prophase



Prometaphase



Metaphase



Anaphase



Telophase



Figure 8.27
Noyau en mitose. Micrographies illustrant les stades successifs de la mitose dans une cellule végétale. Lors de la prophase, les chromosomes se condensent, le nucléole disparaît et l'enveloppe nucléaire se désagrège. À la métaphase, les chromosomes condensés s'alignent au centre du fuseau ; les chromosomes fils migrent aux pôles opposés du fuseau (anaphase) ; durant la télophase, les chromosomes se décondensent et le noyau se reforme. On a coloré les chromosomes en bleu et les microtubules du fuseau en rouge. (Aimablement transmis par Andrew S. Bajer, University of Oregon.)

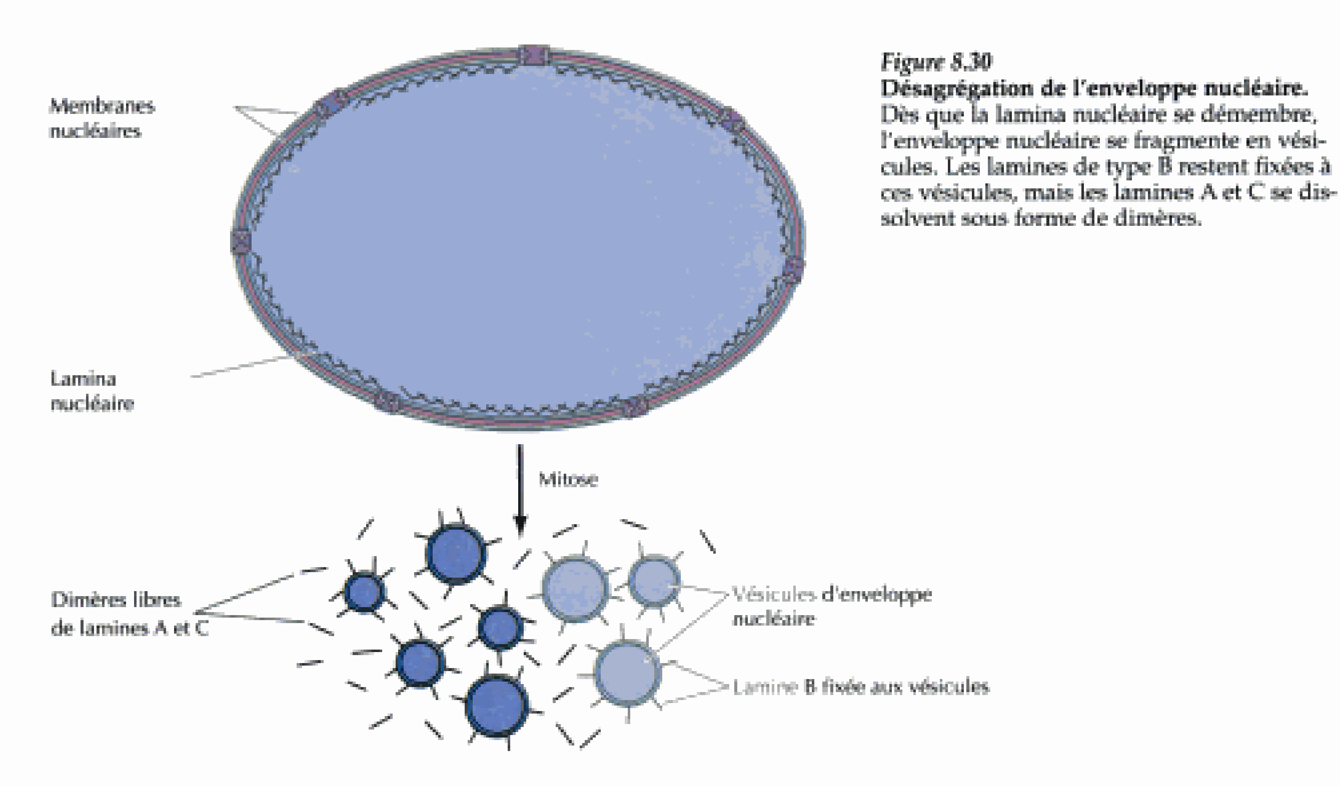


Figure 8.30
Désagrégation de l'enveloppe nucléaire. Dès que la lamina nucléaire se démembre, l'enveloppe nucléaire se fragmente en vésicules. Les lamines de type B restent fixées à ces vésicules, mais les lamines A et C se dissolvent sous forme de dimères.

dans une cellule, on s'aperçoit que leur expression bloque le démembrement normal de la lamina nucléaire au moment où la cellule entre en mitose.

Quand la lamina nucléaire se désagrège, les membranes nucléaires se fragmentent en vésicules (figure 8.30), auxquelles les lamines de type B restent associées, mais les lamines A et C se dissocient des membranes nucléaires pour diffuser dans le cytoplasme sous forme de dimères. Si le démembrement des membranes nucléaires paraît dû à la dissolution de la lamina nucléaire, d'autres événements pourraient aussi intervenir ; il semble que les complexes du pore nucléaire se dissocient en leurs éléments et que la phosphorylation de quelques protéines de ce complexe soit responsable de son démembrement. Les protéines intrinsèques des membranes nucléaires sont également phosphorylées au moment de la mitose ; cette phosphorylation serait nécessaire pour que les membranes nucléaires se détachent des chromosomes et de la lamina nucléaire. On ignore quelle est le rapport causal entre la phosphorylation de ces protéines et le démembrement des membranes nucléaires.

Condensation des chromosomes

L'autre modification importante de la structure nucléaire lors de la mitose est la condensation des chromosomes. La chromatine interphasique, déjà compactée en nucléosomes, se condense environ mille fois pour donner le chromosome comprimé que l'on observe dans la cellule en mitose (figure 8.31). À défaut de cette condensation, les chromosomes ne pourraient se mouvoir le long du fuseau mitotique sans s'enchevêtrer et se briser au cours de leur répartition aux cellules filles. L'ADN ainsi condensé ne pouvant être transcrit, il n'y a plus de synthèse d'ARN durant la mitose. Au moment où les chromosomes se condensent et où la transcription s'arrête, le nucléole devient invisible.

L'ADN condensé des chromosomes métaphasiques semble arrangé en grandes boucles d'environ cent kilobases d'ADN, ancrées à une charpente protéique (voir figure 4.13). Malgré son importance, le mécanisme de

protéines qui avaient été phosphorylées au début de la mitose, entraînant de ce fait la sortie de mitose et l'entrée du noyau en interphase.

Le réassemblage de l'enveloppe nucléaire commence par l'attachement, à la surface des chromosomes, des vésicules formées lors du démembrement des membranes nucléaires (figure 8.32). Ces vésicules fusionnent ensuite pour reformer une membrane double autour des chromosomes. Suivent alors le réassemblage des complexes du pore nucléaire, celui de la lamina

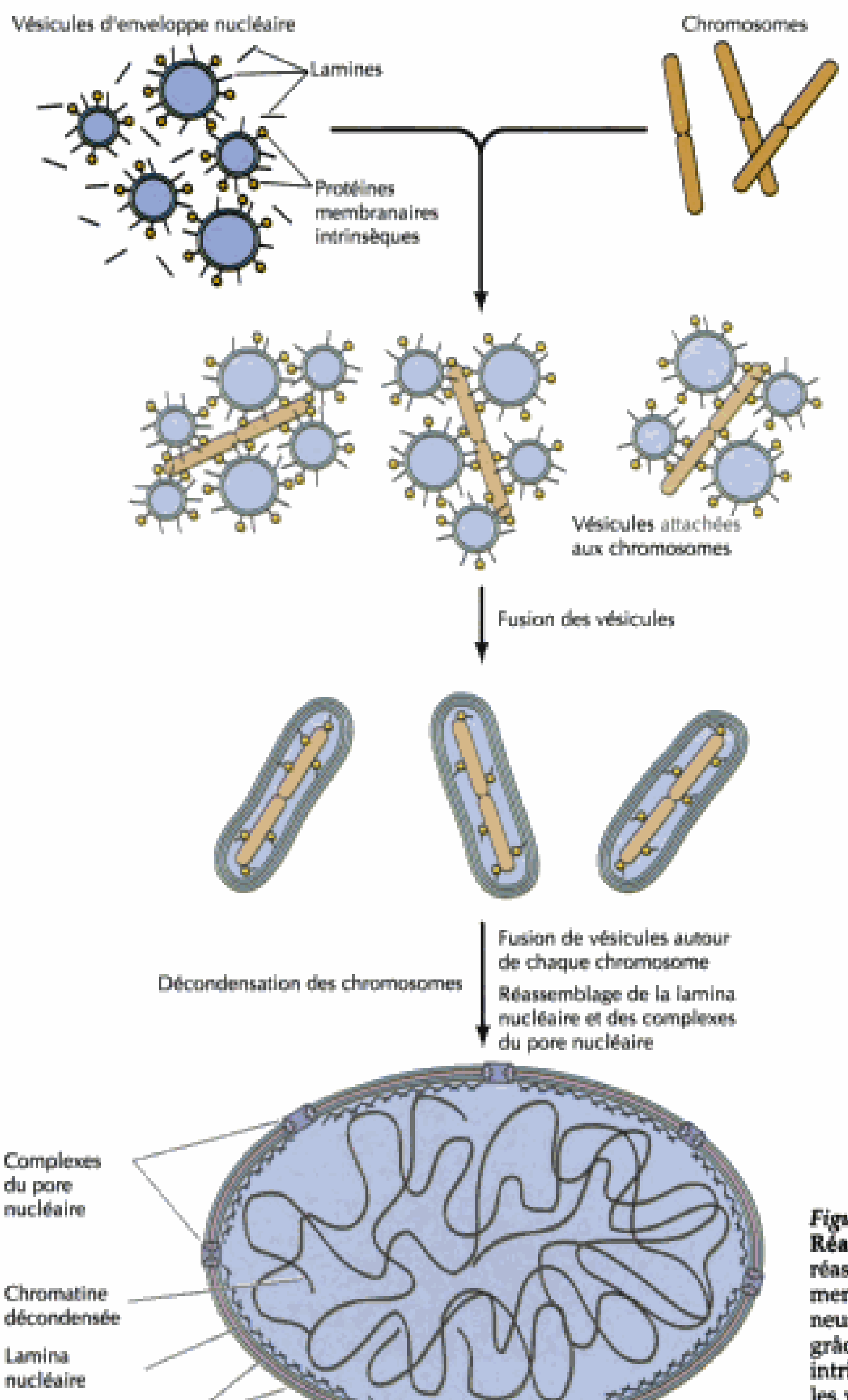


Figure 8.32
Réassemblage de l'enveloppe nucléaire. Le réassemblage de l'enveloppe nucléaire commence par la fixation des vésicules membraneuses aux chromosomes, qui s'accomplirait grâce à la fois aux protéines membranaires intrinsèques et aux lamines de type B. Ensuite, les vésicules se soudent les unes aux autres, la lamina nucléaire se reforme et les chromosomes se décondensent.

nucléaire, enfin la décondensation des chromosomes. Les vésicules fusionnent d'abord pour reformer des membranes autour de chacun des chromosomes, puis celles-ci se soudent pour former un unique noyau complet.

On étudie le mieux le réassemblage du noyau dans des systèmes *in vitro* tels que des extraits d'ovocytes de grenouille ou de cellules de mammifères en mitose, qui sont capables de reformer une enveloppe nucléaire autour de la chromatine ou de l'ADN. L'étude de ces systèmes a montré que l'attachement des vésicules membraneuses aux chromosomes est gouverné par la déphosphorylation d'au moins une protéine vésiculaire, suivie de sa fixation à la chromatine ; on ignore cependant l'identité de ces protéines qui s'attachent à la chromatine ; il semble que non seulement les lamines, mais encore les protéines intrinsèques de la membrane nucléaire interne participent à la fixation des vésicules membraneuses sur les chromosomes à la fin de la mitose.

Le réassemblage initial de l'enveloppe nucléaire autour des chromosomes condensés exclut du noyau néoformé les protéines cytoplasmiques ; ce noyau va grossir en important sélectivement, du cytoplasme, des protéines nucléaires. Comme les signaux de localisation au noyau ne sont pas excisés des protéines importées dans le noyau, les protéines nucléaires elles-mêmes qui s'étaient répandues dans le cytoplasme lors du démembrement nucléaire du début de la mitose peuvent être réimportées dans les deux noyaux formés après la mitose. Le nucléole lui aussi se reforme à mesure que les chromosomes se décondensent et que reprend la transcription des gènes d'ARNr, complétant ainsi pour le noyau le passage de la mitose à l'interphase.

TERMES CLÉ

enveloppe nucléaire, membrane nucléaire, lamina nucléaire, lamine

complexe du pore nucléaire

signal de localisation nucléaire

ribonucléoprotéine nucléaire hétérogène (RNPnh)

Résumé

ENVELOPPE NUCLÉAIRE ET TRAFIC ENTRE NOYAU ET CYTOPLASME

Structure de l'enveloppe nucléaire : L'enveloppe nucléaire sépare le contenu du noyau de celui du cytoplasme, pour en faire un compartiment biochimique distinct, où loge le matériau génétique et où ont lieu la transcription et la maturation de l'ARN dans les cellules d'eucaryote. L'enveloppe nucléaire comprend une membrane interne et une membrane externe, réunies au niveau des complexes du pore nucléaire et soutenues par une lamina nucléaire.

Complexe du pore nucléaire : Un complexe du pore nucléaire est un grand ensemble qui sert de passage exclusif aux molécules qui passent du noyau au cytoplasme ou l'inverse. Les petites molécules diffusent à travers les tunnels ménagés dans les complexes de pore nucléaire, mais les grosses molécules sont transportées par un processus qui dépense de l'énergie.

Importation sélective de protéines dans le noyau : Les protéines destinées au noyau comportent un signal de localisation nucléaire qui les entraîne à travers un complexe du pore nucléaire. Beaucoup de protéines font constamment la navette entre le noyau et le cytoplasme.

Régulation de l'importation des protéines au noyau : L'activité de certaines protéines, tels les facteurs de transcription est gouvernée par une régulation de leur importation dans le noyau.

Transport des ARN : Les ARN sont transportés à travers les complexes du pore nucléaire sous forme de complexes ribonucléoprotéiques. Les

ARN messagers, ARN ribosomiaux et ARN de transfert sont exportés du noyau vers le cytoplasme pour servir à la synthèse protéique. Les petits ARN nucléaires sont d'abord transportés du noyau au cytoplasme, où ils s'associent à des protéines pour donner des RNPpn, qui regagnent le noyau.

INFRASTRUCTURE DU NOYAU

Structure du chromosome et de la chromatine : Le noyau en interphase contient de l'hétérochromatine transcriptionnellement inerte, très condensée, ainsi que de l'euchromatine décondensée. Les chromosomes interphasiques sont arrangés au sein du noyau et partagés en grandes boucles qui fonctionnent comme des unités indépendantes.

hétérochromatine, euchromatine, inactivation du chromosome X, région de commande du locus, isolateur, élément frontière

Domaines fonctionnels au sein du noyau : Certains processus nucléaires, comme la réplication d'ADN et le remaniement des pré-ARNm, sont localisés à des domaines fonctionnels discrets.

Matrice nucléaire : Certains biologistes pensent qu'un réseau fibreux interne (la matrice nucléaire) sert de charpente au noyau. Cependant, comme on n'a pas encore défini les composants de cette matrice nucléaire, d'autres pensent que la matrice serait un agrégat artificiel de protéines et d'acides nucléiques formé au moment de l'extraction des composants solubles plutôt qu'une structure bien réelle de la cellule vivante.

matrice nucléaire

LE NUCLÉOLE

Gènes d'ARN ribosomiaux et organisation du nucléole : Le nucléole s'organise autour des gènes d'ARN ribosomial ; c'est là que s'effectuent la transcription et la maturation de l'ARNr, ainsi que l'assemblage des ribosomes.

nucléole, organisateur nucléolaire

Transcription et remaniements des ARNr : Le transcrit primaire des gènes d'ARNr est le pré-ARNr 45S, tronçonné par la suite en ARNr 18S, 5,8S et 28S. Ces remaniements sont dus aux ARNpn nucléolaires, qui peuvent aussi fonctionner comme chaperons durant l'assemblage des éléments du ribosome.

Assemblage du ribosome : Les éléments ribosomiaux sont construits au sein du nucléole à partir d'ARNr et de protéines ribosomiales.

LE NOYAU PENDANT LA MITOSE

Démembrement de l'enveloppe nucléaire : L'entrée en mitose s'annonce par une activation de la protéine kinase Cdc2. Dans la plupart des cellules, l'enveloppe nucléaire se disloque à la fin de la prophase. La dépolymérisation de la lamina nucléaire est due à la phosphorylation des lamines par Cdc2 et d'autres protéine kinases.

Cdc2

Condensation des chromosomes : La phosphorylation de l'histone H1 est parallèle à la condensation des chromosomes mitotiques, mais on en connaît encore mal le mécanisme.

Réassemblage du noyau pendant l'interphase : L'inactivation de Cdc2 à la fin de la mitose entraîne la réapparition de l'enveloppe nucléaire et la décondensation des chromosomes. Les protéines nucléaires sont alors importées sélectivement à travers les complexes du pore nucléaire.

QUESTIONNAIRE

1. Vous vous intéressez à un facteur de transcription qui est commandé par une phosphorylation de résidus sérine qui inactive son signal de localisation nucléaire. Dans quel sens une mutation de ces sérines en alanine modifierait-elle la localisation subcellulaire de ce facteur de transcription et l'expression de son gène cible ?

2. Quelle serait la conséquence de l'inactivation, par mutation, du signal d'exportation nucléaire d'une protéine navette sur sa distribution subcellulaire ?

3. Considérez la construction ci-dessous, dans laquelle un amplificateur unique agit sur deux promoteurs séparés (P1 et P2). En quoi un isolateur placé entre E et P1 modifierait-il la transcription à partir de P1 et de P2 ? Et qu'arriverait-il si on plaçait un isolateur entre P1 et P2 ?



4. Quand on traite une cellule par de l'actinomycine D (un inhibiteur général de transcription), on empêche le nucléole de se former après la mitose. Un traitement par l'α-amanitine (un inhibiteur spécifique de l'ARN polymérase II) n'a pas le même effet. Pourquoi ?

5. Quelle est la modification post-transcriptionnelle des lamines de type B qui facilite leur association à la membrane nucléaire ? Comment cette modification rend-elle compte de la différence de comportement entre les lamines de type B et les lamines de type A et C pendant la mitose ?

POUR EN SAVOIR PLUS

Référence générales

Newport, J. W. and D. J. Forbes. 1987. The nucleus: Structure, function, and dynamics. *Ann. Rev. Biochem.* 56: 535–565. [R]

Enveloppe nucléaire et trafic nucléocytoplasmique

Adam, S. A. 1995. The importance of importin. *Trends Cell Biol.* 5: 189–191. [R]

Akey, C. W. and M. Radermacher. 1993. Architecture of the *Xenopus* nuclear pore complex revealed by three-dimensional cryoelectron microscopy. *J. Cell Biol.* 122: 1–19. [P]

Davis, L. I. 1995. The nuclear pore complex. *Ann. Rev. Biochem.* 64: 865–896. [R]

Dingwall, C. and R. A. Laskey. 1991. Nuclear targeting sequences—a consensus? *Trends Biochem. Sci.* 16: 478–481. [R]

Dingwall, C. and R. Laskey. 1992. The nuclear membrane. *Science* 258: 942–947. [R]

Forbes, D. J. 1992. Structure and function of the nuclear pore. *Ann. Rev. Cell Biol.* 8: 495–527. [R]

Franke, W. W. 1987. Nuclear lamins and cytoplasmic intermediate filament proteins: A growing multigene family. *Cell* 48: 3–4. [R]

Gerace, L. 1995. Nuclear export signals and the fast track to the cytoplasm. *Cell* 82: 341–344. [R]

Gerace, L. and B. Burke. 1988. Functional organization of the nuclear envelope. *Ann. Rev. Cell Biol.* 4: 353–374. [R]

Gerace, L. and R. Foisner. 1994. Integral membrane proteins and dynamic organization of the nuclear envelope. *Trends Cell Biol.* 4: 127–131. [R]

Gorlich, D., F. Vogel, A. D. Mills, E. Hartmann and R. A. Laskey. 1995. Distinct functions for the two importin subunits in nuclear protein import. *Nature* 377: 246–248. [P]

Hinshaw, J. E., B. O. Carragher and R. A. Milligan. 1992. Architecture and design of the nuclear pore complex. *Cell* 69: 1133–1141. [P]

Izaurralde, E. and I. W. Mattaj. 1995. RNA export. *Cell* 81: 153–159. [R]

Kalderon, D., B. L. Roberts, W. D. Richardson and A. E. Smith. 1984. A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* 39: 499–509. [P]

Lanford, R. E. and J. S. Butel. 1984. Construction and characterization of an SV40 mutant defective in nuclear transport of T antigen. *Cell* 37: 801–813. [P]

Michael, W. M., M. Choi and G. Dreyfuss. 1995. A nuclear export signal in hnRNP A1: A signal-mediated, temperature-dependent nuclear protein export pathway. *Cell* 83: 415–422. [P]

Moore, M. S. and G. Blobel. 1994. A G protein involved in nucleocytoplasmic transport: the role of Ran. *Trends Biochem. Sci.* 19: 211–216. [R]

Nigg, E. A. (1997) Nucleocytoplasmic transport signals, mechanism and regulation. *Nature* **386** :779-786.[R]

Pante, N. and U. Aebi. 1993. The nuclear pore complex. *J. Cell Biol.* 122: 977–984. [R]

Pinol-Roma, S. and G. Dreyfuss. 1993. hnRNP proteins: Localization and transport between the nucleus and cytoplasm. *Trends Cell Biol.* 3: 151–155. [R]

Powers, M. A. and D. J. Forbes. 1994. Cytosolic factors in nuclear transport: What's importin? *Cell* 79: 931–934. [R]

Rout, M. P. and S. R. Wente. 1994. Pores for thought: Nuclear pore complex proteins. *Trends Cell Biol.* 4: 357–365. [R]

Vandromme, M., C. Gauthier-Rouviere, N. Lamb and A. Fernandez. 1996. Regulation of transcription factor localization: Fine-tuning of gene expression. *Trends Biochem. Sci.* 21: 59–64. [R]

Infrastructure du noyau

Alland, L. *et al.* (1997) Role for N-CoR and histone deacetylase in Sin-3-mediated transcriptional repression. *Nature* **387** :49.[O]

Berezney, R. and D. S. Coffey. 1975. Nuclear protein matrix: Association with newly synthesized DNA. *Science* 189: 291–293. [P]

Corces, V. G. 1995. Chromatin insulators: Keeping enhancers under control. *Nature* 376: 462–463. [R]

Dillon, N. and F. Grosveld. 1993. Transcriptional regulation of multigene loci: Multilevel control. *Trends Genet.* 9: 134–137. [R]

Gasser, S. M. and U. K. Laemmli. 1987. A glimpse at chromosomal order. *Trends Genet.* 3: 16–22. [R]

Gilson, E., T. Laroche and S. M. Gasser. 1993. Telomeres and the functional architecture of the nucleus. *Trends Cell Biol.* 3: 128–134. [R]

Hozak, P. and P. R. Cook. 1994. Replication factories. *Trends Cell Biol.* 4: 48–49. [R]

Kramer, J., Z. Zachar and P. M. Bingham. 1994. Nuclear pre-mRNA metabolism: Channels and tracks. *Trends Cell Biol.* 4: 35–37. [R]

Lyon, M. F. 1992. Some milestones in the history of X-chromosome inactivation. *Ann. Rev. Genet.* 26: 17–28. [R]

Manuelidis, L. 1990. A view of interphase chromosomes. *Science* 250: 1533–1540. [R]

9

Tri et transport des protéines

Réticulum endoplasmique, appareil de Golgi et lysosomes

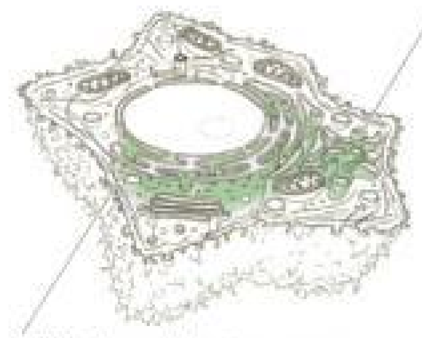
Outre son noyau, la cellule d'eucaryote se distingue de la cellule de procaryote par la présence dans son cytoplasme de plusieurs types d'organites bordés d'une ou de plusieurs membranes ; ces organites sont des compartiments bien séparés où s'effectuent diverses activités métaboliques particulières ; ce cloisonnement du cytoplasme permet à la cellule d'eucaryote de fonctionner efficacement en dépit de sa grande taille (environ mille fois le volume d'une bactérie).

La complexité de l'organisation interne de la cellule eucaryotique rend bien difficiles le tri et l'adressage des protéines à leur destination finale. Le tri des protéines commence pendant que la traduction de leur chaîne se poursuit. Les protéines destinées au réticulum endoplasmique, au Golgi, aux lysosomes et à la membrane plasmique, ainsi que celles qui sont sécrétées, se forment sur les ribosomes liés à la membrane du réticulum endoplasmique. Pendant que la traduction s'effectue, les chaînes polypeptidiques passent dans la lumière du réticulum endoplasmique, où les chaînes se reploient et sont remaniées. Du réticulum endoplasmique, les protéines sont transportées dans les vésicules du Golgi, qui les remanient et les trient avant de les livrer aux lysosomes ou à la membrane plasmique, ou de les sécréter dans le milieu extracellulaire. Réticulum endoplasmique, appareil de Golgi et lysosomes se distinguent donc des autres organites cytoplasmiques par le fait qu'ils prennent part au remaniement des protéines et sont mis en communication par le va-et-vient de vésicules de transport.

RÉTICULUM ENDOPLASMIQUE

Le **réticulum endoplasmique (RE)** est un réseau de tubules et de sacs (citernes) bordés d'une membrane qui, de la membrane nucléaire, s'étendent à travers le cytoplasme (figure 9.1). Le réticulum endoplasmique se limite en tout point par une membrane continue et est l'organite prépondérant de la plupart des cellules d'eucaryote. Sa membrane compte pour près de la moitié des membranes cellulaires et l'espace qu'elle délimite (lumière ou citernes du RE) représente jusqu'à 10 % du volume cellulaire.

Nous décrirons plus loin deux types de RE, chargés chacun d'une tâche particulière dans la cellule : le **RE rugueux**, dont la face externe est couver-



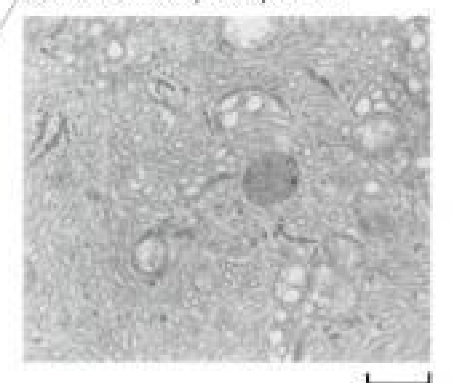
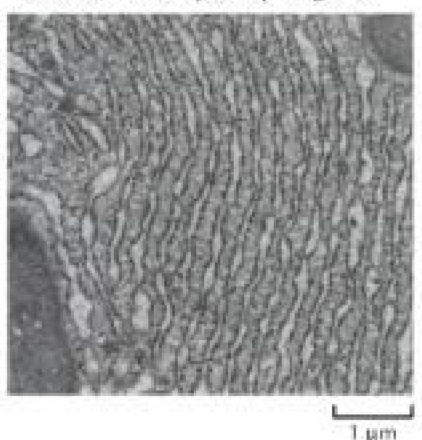


Figure 9.1
Le réticulum endoplasmique (RE). (A) Micrographie électronique d'une coupe dans le réticulum endoplasmique rugueux d'un hépatocyte de rat. Les ribosomes sont attachés à la face cytosolique de la membrane du RE. (B) Micrographie électronique d'un réticulum endoplasmique lisse, dans le corps jaune où s'effectue la synthèse des hormones stéroïdes. (A, Richard Rodewald/Biological Photo Service ; B, Barry F. King/Biological Photo Service).

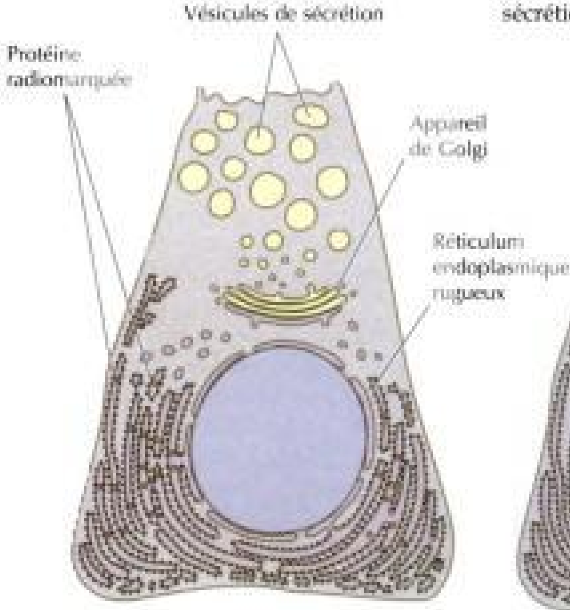


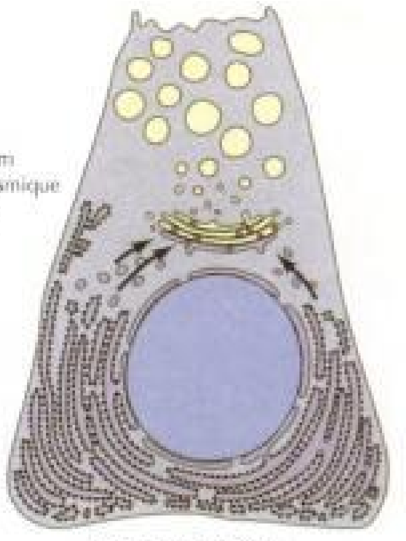
te de nombreux ribosomes et qui sert à remanier les protéines, et le **RE lisse**, dépourvu de ribosomes et qui n'intervient pas dans le métabolisme des protéines, mais bien dans celui des lipides.

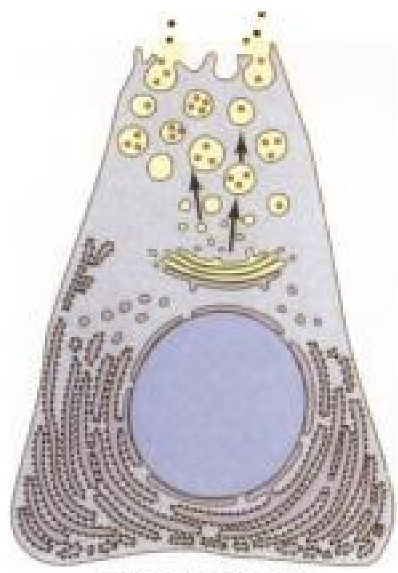
Réticulum endoplasmique et sécrétion de protéines

C'est George Palade et ses collaborateurs qui, en 1960, démontrèrent le rôle joué par le réticulum endoplasmique dans la maturation et le tri des protéines (figure 9.2). Ils étudiaient le sort des protéines néosynthétisées dans des cellules spécialisées du pancréas (les cellules acineuses) qui sécrètent les enzymes digestifs dans l'intestin grêle. Comme la majeure partie des protéines formées par ces cellules est sécrétée, Palade et son équipe pouvaient trouver le cheminement des protéines sécrétées rien qu'en marquant les protéines naissantes par des acides aminés radioactifs ; il leur suffisait ensuite

Figure 9.2
Voie de sécrétion. On a marqué des cellules acineuses pancréatiques, qui sécrètent dans le tube digestif la majorité des protéines qu'elles synthétisent, avec un acide aminé radioactif, de façon à suivre le trajet les protéines de sécrétion à l'intérieur de la cellule. Après une brève incubation (3 minutes) en présence d'acides aminés radioactifs, l'autoradiographie montre que les protéines qui viennent d'être synthétisées se trouvent dans le RE rugueux. Quand on continue l'incubation en présence d'un excès d'acides aminés non radioactifs (chasse), on retrouve ces protéines dans le Golgi, puis plus tard dans des vésicules de sécrétion, enfin contre la membrane plasmique et à l'extérieur de la cellule.





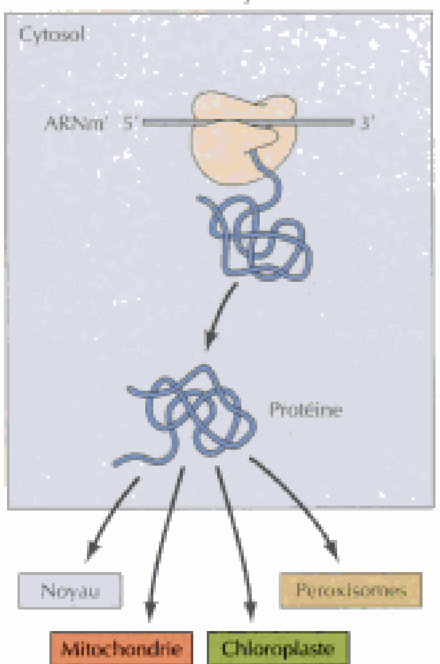


de mettre les protéines radioactives en évidence par autoradiographie pour observer la suite des événements caractérisant la voie sécrétoire.

Après un bref contact des cellules acineuses pancréatiques avec un acide aminé radioactif, les protéines néoformées se trouvaient marquées dans le RE rugueux : c'était donc le site de synthèse des protéines de sécrétion. Quand on incubait ensuite ces cellules en présence d'acides aminés non radioactifs (une méthode appelée chasse, parce qu'elle chasse les acides aminés radioactifs introduits auparavant), les protéines marquées se trouvaient dans l'appareil de Golgi. Après des périodes de chasse prolongées, les protéines radioactives se dirigeaient du Golgi vers la surface cellulaire *via* des **vésicules de sécrétion**, qui se soudaient enfin à la membrane plasmique pour livrer leur contenu dans le milieu extracellulaire.

Ces travaux permirent de définir le chemin suivi par les protéines sécrétées, à savoir, du RE rugueux au Golgi, puis aux vésicules sécrétoires, enfin au milieu extracellulaire. D'autres travaux confirmèrent ces résultats et montrèrent que cette voie n'est pas particulière aux protéines sécrétées par la cellule ; en effet, les protéines destinées à la membrane plasmique et aux lysosomes passent aussi du RE rugueux au Golgi avant d'atteindre leur destination. D'autres protéines encore empruntent les premières étapes de la voie sécrétoire, mais sont ensuite immobilisées pour jouer leur rôle physiologique dans le RE ou dans l'appareil de Golgi.

Le passage de protéines dans la lumière du réticulum endoplasmique représente donc un point de branchement crucial dans le trafic des protéines de la cellule d'eucaryote, puisqu'il distingue les protéines formées sur des ribosomes libres de celles qui sont synthétisées sur des ribosomes ancrés aux membranes du RE (figure 9.3). Les protéines qui fonctionneront dans le cytosol et celles qui seront incorporées au noyau, aux mitochondries, aux choloroplastes ou aux peroxysomes se forment sur des ribosomes libres et sont libérées dans le cytosol après leur synthèse. Par contre, la plupart des protéines de sécrétion ou de celles qui vont être incorporées au RE, au Golgi, aux lysosomes ou à la membrane plasmique sont synthétisées sur des ribosomes fixés à la membrane puis transférées dans la lumière du RE au cours de leur traduction.



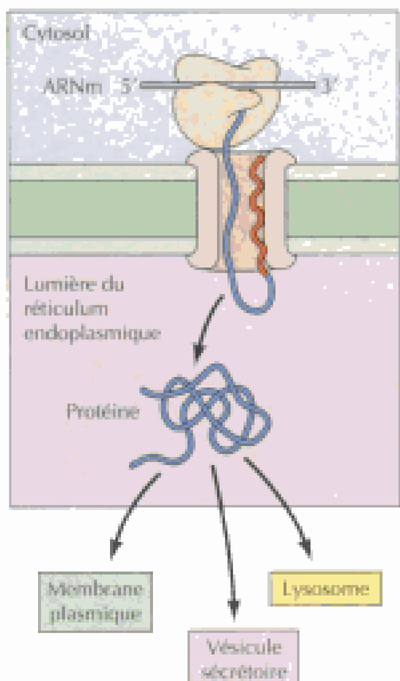


Figure 9.3
Schéma du tri des diverses protéines. Les protéines synthétisées sur des ribosomes libres se maintiennent dans le cytosol ou sont transportées vers le noyau, les mitochondries, les chloroplastes ou les peroxysomes. Par contre, les protéines synthétisées sur des ribosomes attachés aux membranes sont injectées dans la lumière du RE pendant que la synthèse de leur chaîne se poursuit ; ensuite elles seront soit retenues dans le RE, soit transportées dans les citernes du Golgi, puis de là, vers les lysosomes, la membrane plasmique ou l'extérieur de la cellule par vésicules sécrétoires interposées.

Adressage de protéines au réticulum endoplasmique

L'ancrage de ribosomes à la membrane du RE est dû à la séquence d'acides aminés de la chaîne polypeptidique en cours de synthèse et non à un trait singulier du ribosome lui-même ; il n'existe en effet aucune différence fonctionnelle entre un ribosome libre et un ribosome fixé à une membrane, et toute synthèse de chaîne protéique s'amorce sur un ribosome libre du cytosol. Les ribosomes en train de faire la synthèse d'une chaîne destinée à être sécrétée sont attirés contre le réticulum endoplasmique par la **séquence signal** du bout aminé de la chaîne polypeptidique naissante ; ces séquences signal sont de courtes séries de résidus d'acide aminé hydrophobes qui seront élagués de la chaîne polypeptidique lors de son transfert dans la lumière du RE.

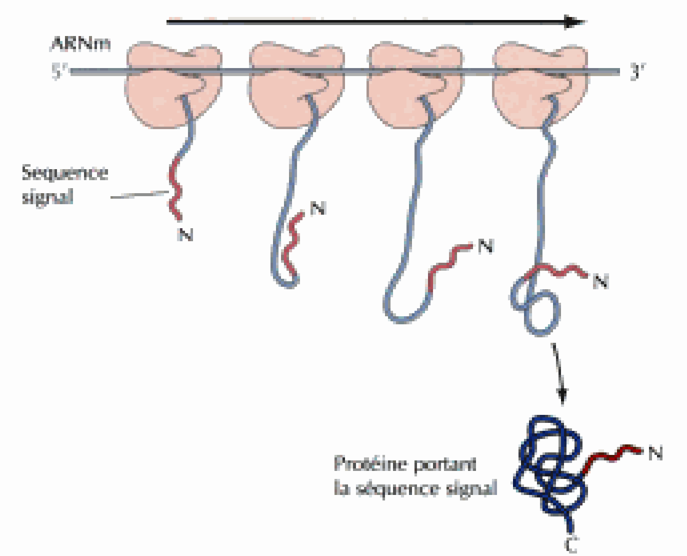
On détermina le rôle général joué par les séquences signal dans l'adressage des protéines à leur site cellulaire approprié au cours de recherches sur l'entrée des protéines de sécrétion dans la lumière du RE. Ces expériences mettaient en œuvre des préparations de RE rugueux *in vitro*, purifiées à partir d'extraits cellulaires par centrifugation en gradient de densité (figure 9.4) ; quand on pulvérise une cellule, son RE se désagrège en petites vésicules appelées **microsomes** ; comme les vésicules originaires du RE rugueux sont couvertes de ribosomes, elles se séparent aisément des vésicules similaires, issues du RE lisse ou d'autres membranes (notamment de la membrane plasmique) ; en effet, comme la haute teneur en ARN des ribosomes accroît la densité des vésicules membranaires auxquelles ils sont arrimés, on arrive facilement à purifier ces vésicules dérivées du RE rugueux (microsomes rugueux) par une centrifugation à l'équilibre en gradient de densité.

David Sabatini et Günther Blobel, les premiers, proposèrent en 1971 que le signal d'attachement des ribosomes au RE n'était autre qu'une séquence d'acides aminés du bout aminé de la chaîne polypeptidique naissante ; plaidaient en faveur de cette hypothèse les résultats de la traduction *in vitro* des ARNm codant des protéines de sécrétion, par exemple les immunoglobulines (figure 9.5). Quand on traduit *in vitro* sur des ribosomes libres un ARNm codant une protéine de sécrétion, on remarque que la protéine formée est légèrement plus grosse que la protéine normalement sécrétée, mais si, à ce système de traduction, on ajoute des microsomes, la protéine formée *in vitro* s'incorpore aux microsomes et est ramenée à la taille correcte. Ces expériences permirent de préciser l'hypothèse du signal, à savoir que la séquence signal siégeant au bout aminé de la chaîne polypeptidique entraîne celle-ci dans le microsome, avant d'être clivée par une protéase microsomiale. De nombreuses expériences sont venues confirmer ce modèle, notamment des expériences de recombinaison d'ADN, montrant qu'il suffit d'attacher une séquence signal à une protéine normalement non sécrétée pour que la protéine hybride passe dans la lumière du RE rugueux.

On comprend à présent très bien le mécanisme qui attire les protéines de sécrétion dans le RE. La séquence signal comporte environ 20 résidus d'acide aminé, dont une série de résidus hydrophobes, placée habituellement au bout aminé de la chaîne polypeptidique (figure 9.6). A leur sortie du ribosome, les séquences signal sont reconnues et capturées par la **particule de reconnaissance du signal (PRS)**, comportant six polypeptides et un petit ARN cytoplasmique (**ARN 7SL**).

Réticulum endoplasmique lisse
Réticulum endoplasmique rugueux
Désintégration des cellules
Ribosome
Microsomes rugueux
Microsomes lisses
Centrifugation en gradient de densité
Microsomes lisses
Densité croissante
Microsomes rugueux

Figure 9.4
Purification de réticulum endoplasmique rugueux. Quand on désintègre des cellules, le RE se fragmente en petites vésicules appelées microsomes. Les microsomes issus du RE rugueux (microsomes rugueux) portent des ribosomes à leur surface. Comme les ribosomes ont une teneur élevée en ARN, les microsomes rugueux sont plus denses que les microsomes lisses ; on arrive à les séparer les uns des autres par centrifugation à l'équilibre en gradient de densité.



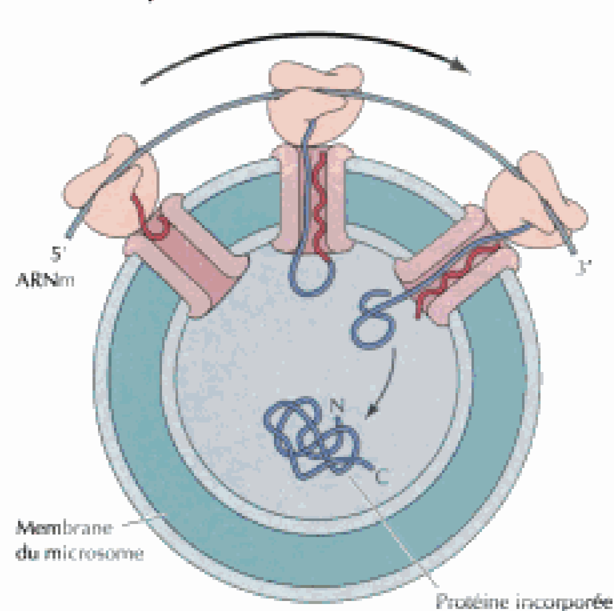


Figure 9.5
Incorporation de protéines de sécrétion dans des microsomes. Les protéines de sécrétion sont acheminées au RE par une séquence signal siégeant à leur bout aminé, qui est amputée quand la chaîne polypeptidique naissante s'insère dans le RE. On l'a prouvé en montrant que la traduction *in vitro* d'ARNm de protéines sécrétées sur des ribosomes libres produisait des chaînes qui conservaient leur séquence signal et, de ce fait, étaient un peu plus grandes que les chaînes normalement sécrétées. Par contre, quand on ajoutait des microsomes au système de traduction, les chaînes polypeptidiques naissantes s'incorporaient aux microsomes et les séquences signal étaient amputées par protéolyse.

L'ancrage de PRS à la chaîne empêche son allongement et entraîne le complexe (particule PRS, ribosome et chaîne polypeptidique naissante) vers le RE rugueux *via* un attachement au récepteur PRS porté par la membrane du RE (figure 9.7). Cette arrimage au récepteur détache la PRS du ribosome et de la séquence signal de la chaîne polypeptidique naissante ; ce ribosome s'attache ensuite à un complexe de translocation de protéine siégeant dans la membrane du RE et la séquence signal s'insinue dans un tunnel de la membrane. Alors, la traduction reprend et la chaîne polypeptidique naissante est injectée à travers la membrane dans le RE. Au cours de la traduction, la séquence signal est amputée par **la peptidase du signal** et le polypeptide libéré dans la lumière du RE.

Plusieurs expériences, dont des mesures de conductibilité ionique et des traçages par sondes fluorescentes, ont montré que les chaînes polypeptidiques sont transférées d'un côté à l'autre de la membrane du RE *via* des tunnels aqueux ménagés dans des protéines transmembranaires ; ces tunnels s'ouvriraient sous l'effet de la séquence signal et le resteraient par attachement du ribosome ; ainsi, la chaîne polypeptidique naissante passerait la membrane au fur et à mesure de sa formation. La recherche par les biochimistes et les généticiens du principal constituant du tunnel à protéine du RE dans les levures et les cellules de mammifère a identifié le complexe Sec61, composé de trois protéines transmembranaires ; Sec61 attache le ribosome à la membrane du RE et la chaîne polypeptidique naissante est probablement transférée directement du ribosome à un tunnel formé dans la protéine Sec61. Les expériences de Tom Rapoport et de son équipe ont fourni une preuve directe du rôle capital joué par Sec 61 : en insérant Sec61 et le récepteur de PRS dans des vésicules lipidiques, ils ont pu reconstituer une machinerie qui transborde bien les protéines. Les protéines de Sec61 de levure et de mammifère ressemblent fort aux protéines de la membrane plasmique de *E. coli* qui transfèrent les polypeptides sécrétés, démontrant ainsi que la machinerie de translocation des protéines s'est bien conservée au cours de l'évolution des procaryotes et des eucaryotes.

Figure 9.6
Séquence signal de l'hormone de croissance. La plupart des séquence signal comportent une série d'acides aminés hydrophobes, précédée d'un résidu basique (ici, l'arginine).



EXPÉRIENCE CLÉ



L'hypothèse du signal

Transfer of Proteins across Membranes. I. Presence of Proteolytically Processed and Unprocessed Nascent Immunoglobulin Light Chains on Membrane-Bound Ribosomes of Murine Myeloma

Günter Blobel and Bernhard Dobberstein
Rockefeller University, New York
Journal of Cell Biology, 1975, Volume 67, pages 835-851

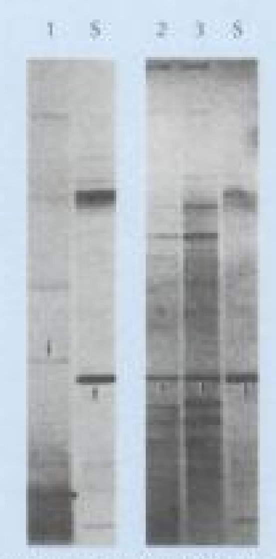
Contexte

Longtemps la question s'est posée de savoir comment telle ou telle chaîne polypeptidique passe à travers la membrane appropriée. Des travaux des années '50 et '60 montraient que les protéines sécrétées sont synthétisées sur des ribosomes arrimés aux membranes puis transférées à travers ces membranes au cours de leur synthèse. Ceci n'expliquait pas cependant pourquoi les ribosomes effectuant la synthèse des protéines de sécrétion se fixent aux membranes alors que les ribosomes synthétisant les protéines cytosoliques ne le font pas ; Günter Blobel et Davis Sabatini avancèrent enfin en 1971 une hypothèse pour expliquer cette différence. Ils proposèrent alors que (1) les ARNm qui seront traduits sur des ribosomes attachés à une membrane comportent une série singulière de codons juste en amont du site d'amorçage, que (2) la traduction de ces codons produit une séquence unique au bout aminé de la chaîne polypeptidique naissante (la séquence signal) et que (3) cette séquence signal attire le ribosome contre la membrane. En 1975, Blobel et Dobberstein publièrent les résultats d'une série d'expériences qui plaidaient pour cette interprétation ; ils proposaient en outre « une version quelque peu plus détaillée de cette hypothèse, pour laquelle ils proposaient le nom, devenu classique, d'hypothèse du signal ».

Preuve expérimentale

Un myélome est une tumeur lymphocytaire B qui secrète de grandes quantités d'immunoglobulines ; c'est pourquoi il est un bon modèle pour étudier la sécrétion des protéines. Les études originales du laboratoire de Cesar Milstein avaient montré que les protéines obtenues en traduisant *in vitro* les ARNm de chaînes légères d'immunoglobulines contiennent à leur bout aminé une vingtaine de résidus d'acide aminé dont sont dépourvues les chaînes légères sécrétées par les cellules. Ce résultat suggérait que ces résidus d'acide aminé commandaient la fixation du ribosome sur la membrane. Pour le prouver Blobel et Dobberstein étudièrent la synthèse de chaînes légères par des ribosomes attachés aux membranes préparées à partir de cellules de myélome.

En accord avec des résultats antérieurs, la traduction *in vitro* d'ARNm de chaîne légère sur des ribosomes libres donnait une protéine de taille supérieure à la chaîne légère sécrétée par la cellule (voir la figure) ; par contre, la traduction d'ARNm associés à des ribosomes fixés à la membrane des cellules de myélome produisait une protéine de taille identique à la chaîne légère normalement sécrétée par la cellule ; en outre, les chaînes légères synthétisées par des ribosomes qui restaient fixés aux microsomes étaient réfractaires à la digestion en



La traduction *in vitro* d'un ARNm de chaîne légère d'immunoglobuline sur des ribosomes libres (piste 1) donne un produit qui, dans une électrophorèse en gel, migre plus lentement que les chaînes légères sécrétées par la cellule. Par contre, les chaînes légères obtenues *in vitro* par traduction d'ARNm sur des ribosomes fixés aux membranes (piste 2) sont de même taille que les chaînes sécrétées. En outre, ces produits de la traduction *in vitro* sur des ribosomes fixés aux membranes sont insensibles à une digestion protéasique (piste 3), une preuve que leur passage dans la lumière des microsomes les protège de l'action des protéases.

Insertion de protéines dans la membrane du réticulum endoplasmique

Comme on vient de le voir, les protéines destinées à la sécrétion et celles qui vont rester dans la lumière du RE, des citernes du Golgi ou des lysosomes traversent la membrane du RE pour atteindre sa lumière ; cependant, les protéines qui iront s'insérer dans la membrane plasmique et dans les membranes du RE, du Golgi et des lysosomes vont s'implanter d'abord dans la

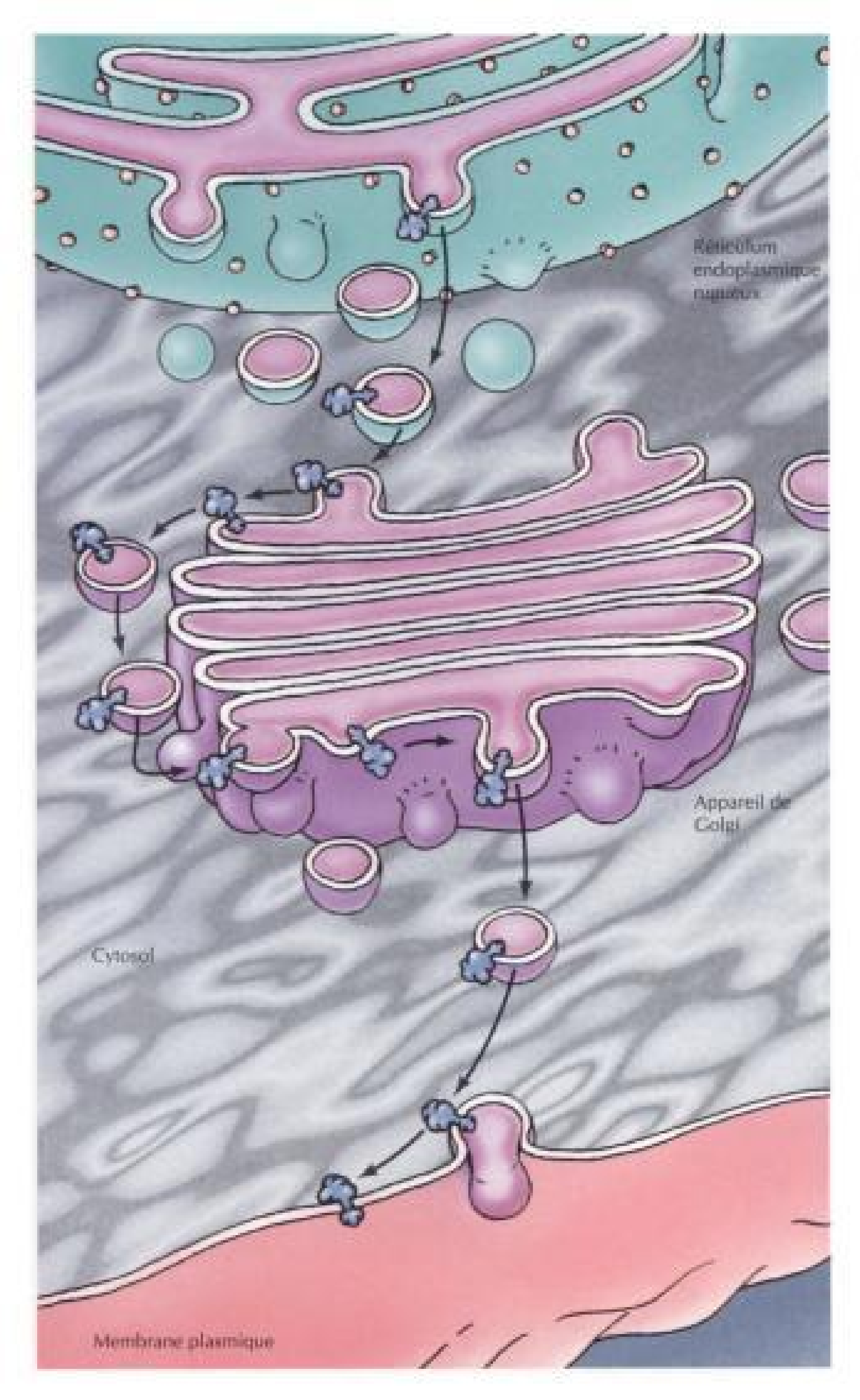
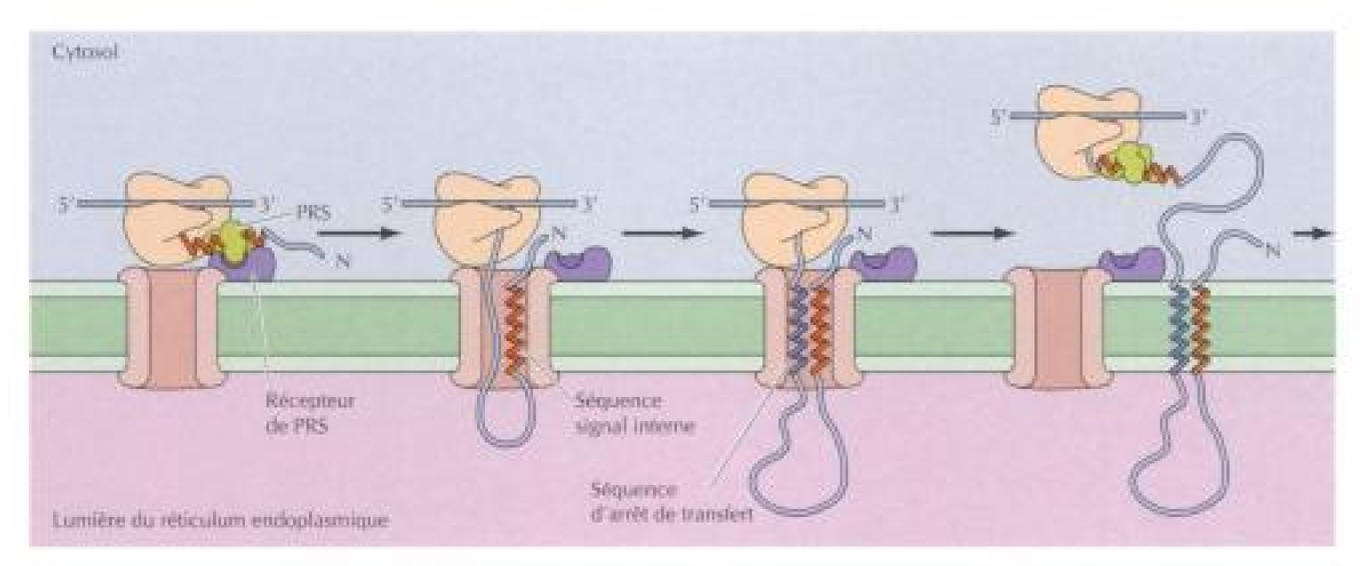


Figure 9.9
Siège de la voie sécrétoire.
Les citernes du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi sont l'équivalent topographique du milieu extracellulaire. Aussi, les portions des chaînes polypeptidiques qui sont transférées dans la lumière du RE se retrouvent-elles dans le milieu extracellulaire après l'arrivée des chaînes à la membrane plasmique.

membrane du RE ; aussi, selon l'orientation de cette séquence signal, est-ce pour telle protéine le bout aminé, pour telle autre le bout carboxyle qui viendra au contact du cytosol par ce mécanisme.

Les protéines qui traversent la membrane plusieurs fois le doivent à une série de séquences signal internes alternant avec des séquences d'arrêt de transfert ; si, par exemple, une séquence signal interne place le bout aminé



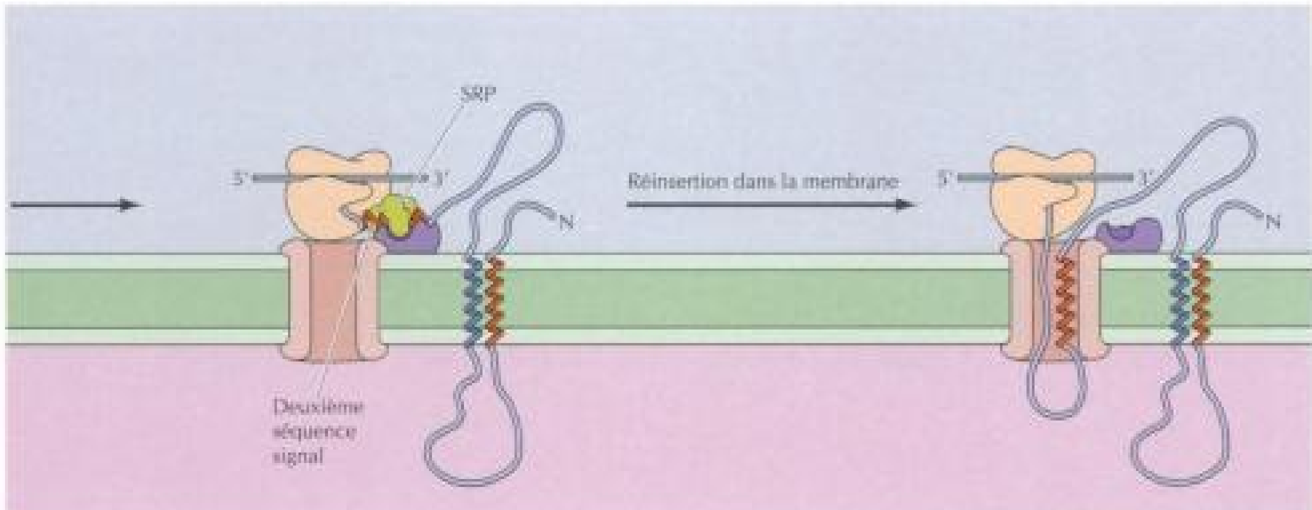


Figure 9.12
Insertion d'une protéine à multiples passages transmembranaires.
La séquence signal interne entraîne ici le bout aminé du polypeptide du côté cytosolique de la membrane. La séquence d'arrêt de transfert qui suit provoque la formation d'une boucle dans la lumière du RE, puis la traduction se poursuit dans le cytosol. Une autre séquence signal interne provoque alors la réinsertion de la chaîne dans la membrane du RE, pour former une boucle dans le cytosol. S'il se produit à plusieurs reprises, ce processus donne une protéine à multiples domaines transmembranaires.

d'une protéine dans le cytosol (figure 9.12) et que le ribosome traduit ensuite une séquence d'arrêt de transfert, le polypeptide va former une boucle dans la lumière du RE et la synthèse protéique va se poursuivre du côté cytosolique de la membrane. Si le ribosome traduit ensuite une autre séquence signal interne, la chaîne polypeptidique naissante s'insérera à nouveau dans la membrane du RE, en laissant son nouveau domaine former une autre boucle du côté cytosolique de la membrane. Le processus peut encore se reproduire, de sorte que des suites de séquences signal et de séquences d'arrêt de transfert produisent une protéine qui traverse plusieurs fois la membrane, avec des domaines en forme de boucle situés de part et d'autre de la membrane.

Reploiement et maturation des chaînes polypeptidiques dans le RE

Nous avons décrit au chapitre 7 comment une chaîne polypeptidique acquiert sa conformation correcte dans l'espace, comment des protomères s'assemblent pour former un ensemble pluriprotéique et quelles sont les réactions covalentes subies par les protéines au cours de leur maturation. Pour les protéines de sécrétion, la plupart de ces événements, par exemple l'amputation protéolytique du peptide signal, ont lieu durant la translocation à travers la membrane du RE ou après passage dans sa lumière. C'est aussi dans le RE que les chaînes se reploient, que les protomères s'assem-

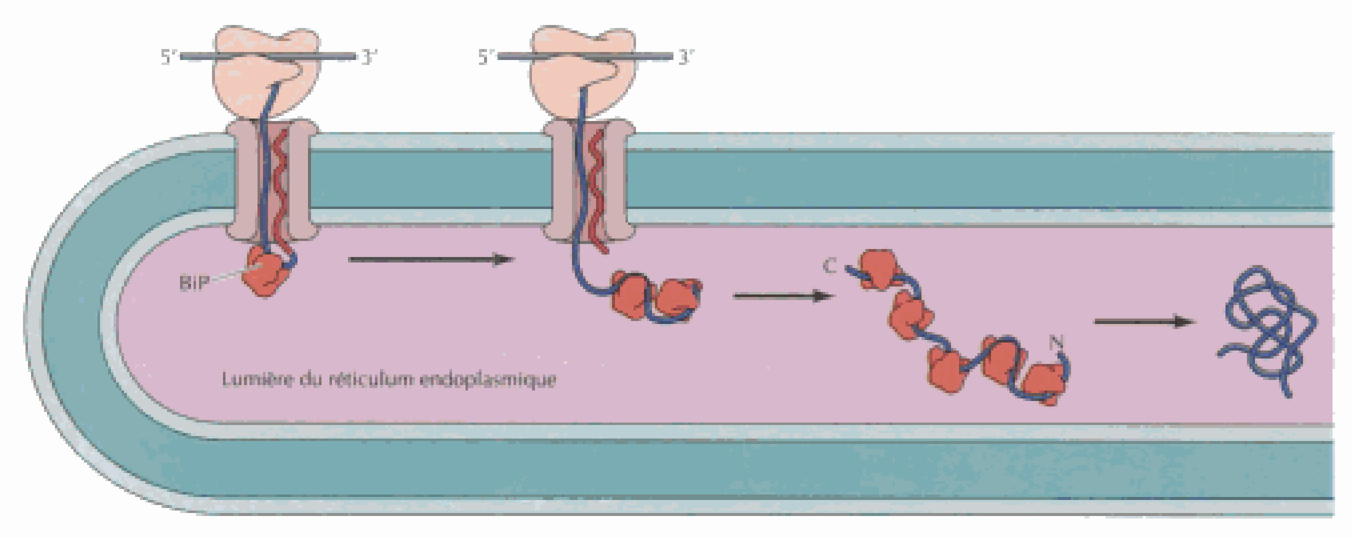
blent, que se forment les liaisons disulfure, qu'apparaissent les premières glycosylations et le greffage d'une ancre glycolipidique à certaines protéines de membrane plasmique ; le rôle principal des protéines résidant dans la lumière du RE est en effet de catalyser le reploiement et l'assemblage des chaînes qui viennent de traverser la membrane.

Comme on l'a vu, les chaînes protéiques traversent la membrane du RE sous forme déployée, au fur et à mesure que leur chaîne est traduite par un ribosome ; aussi est-ce dans la lumière du RE que ces polypeptides prennent leur conformation tridimensionnelle, grâce à l'assistance de chaperons moléculaires qui catalysent le reploiement (voir chapitre 7). Ainsi l'une des principales protéines du RE, BiP (pour *binding protein*), appartient à la famille des chaperons Hsp70 ; il semble que BiP s'attache aux chaînes déployées dès qu'elles émergent de la membrane du RE, pour catalyser leur reploiement et leur assemblage avec d'autres protomères (figure 9.13). Celles qui sont correctement repliées et assemblées sont libérées par BiP et prêtes à être livrées à l'appareil de Golgi, sinon, elles restent fixées à BiP et demeurent dans le RE ou y sont détruites, sans poursuivre leur chemin dans la voie de sécrétion.

Un point important du reploiement et de l'assemblage des chaînes dans le RE est la formation de liaisons disulfure ; il ne s'en forme pas dans le cytosol, car des conditions réductrices y maintiennent les résidus cystéine sous forme réduite (–SH). Par contre, dans le RE, un milieu oxydant favorise la formation de liaisons disulfure (S–S), si importantes pour maintenir la structure des protéines de sécrétion et des protéines ancrées à la surface cellulaire. La formation des liaisons disulfure est catalysée dans le RE par l'**isomérase des liaisons disulfure protéiques** (voir figure 7.21).

Au sein du RE, pendant que leur traduction se poursuit, les protéines subissent aussi une glycosylation de certains résidus asparagine (glycosylation sur N) (figure 9.14). Comme on l'a montré au chapitre 7, un module oligosaccharidique de 14 unités est greffé à certains résidus asparaginyle de la chaîne naissante qui entre dans le RE ; cet oligosaccharide se forme sur un lipide porteur (le dolichol) ancré dans la membrane du RE, puis est transféré en bloc aux résidus asparagine accepteurs des séquences consensus -Asn-X-Sér/Thr- par un enzyme membranaire appelé oligosaccharidyl transférase. Quatre résidus glucidiques (trois de glucose et un de mannose) sont

Figure 9.13
Reploiement d'une chaîne polypeptidique dans le RE. Le chaperon moléculaire BiP s'attache à la chaîne polypeptidique au moment où elle émerge de la membrane du RE, pour catalyser son reploiement et son assemblage dans le RE.



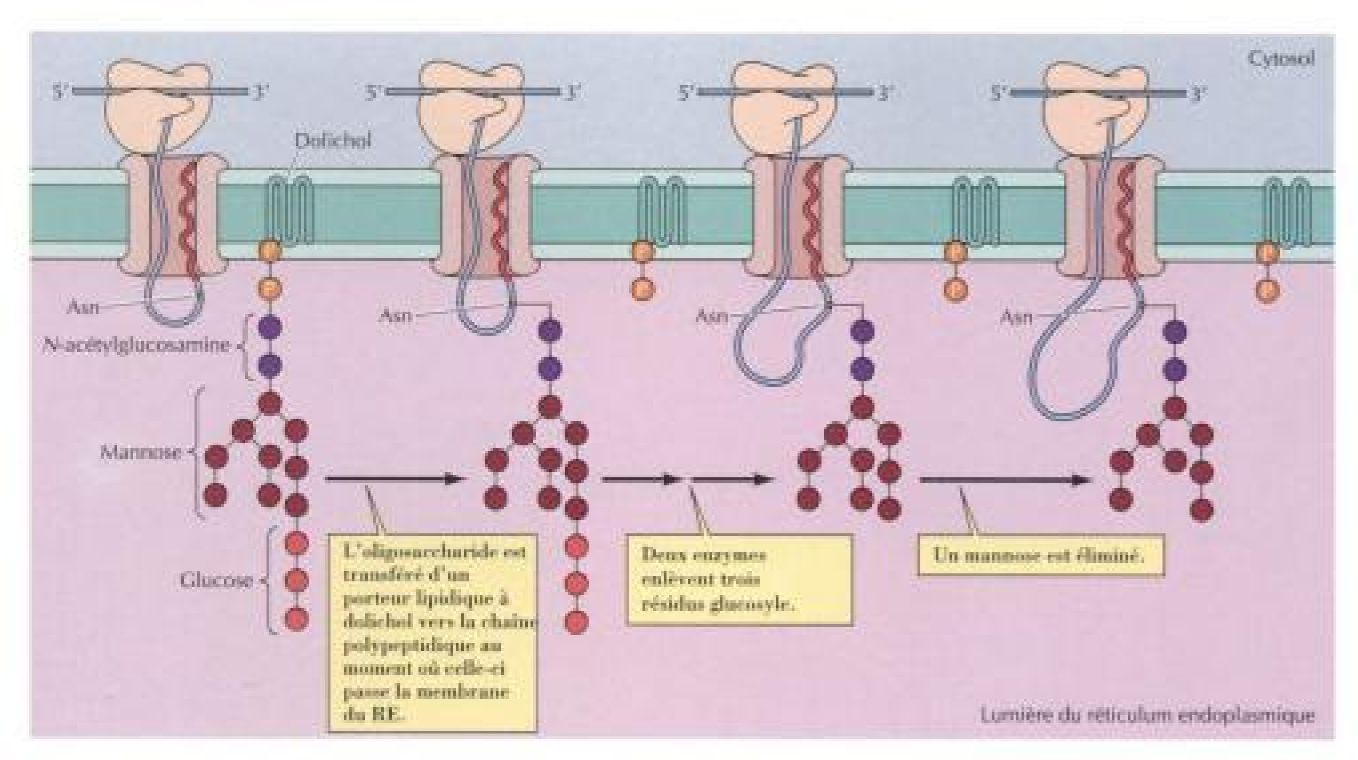


Figure 9.14
Glycosylation d'une protéine dans le RE.

amputés avant que la protéine ne quitte le RE, ensuite la protéine passe dans l'appareil de Golgi pour y subir encore d'autres modifications (voir ci-après).

Certaines protéines sont ancrées à la membrane plasmique non pas par certains tronçons transmembranaires de leur chaine, mais par des glycolipides. Comme ceux-ci contiennent du phosphatidylinositol, on les appelle **ancres à glycosylphosphatidylinositol (GPI)**, dont la structure apparaît dans la figure 7.32. Ces ancres GPI se forment au niveau de la membrane du RE ; dès que sont traduites certaines chaînes arrimées à la membrane par un tronçon transmembranaire C-terminal, ces ancres GPI sont greffées à leur bout carboxyle (figure 9.15). La région transmembranire de la protéine est ensuite échangée contre une ancre GPI, de sorte que ces protéines ne tiennent à la membrane que par cette ancre GPI. Tout comme les autres protéines transmembranaires, ces protéines sont transférées vers la surface cellulaire en tant que composant membranaire soumis à la voie sécrétoire. Leur orientation dans la membrane du RE fait que les protéines ancrées par une ancre GPI flottent dans le milieu extracellulaire, retenues cependant à la membrane par leur ancre GPI.

Réticulum endoplasmique lisse et synthèse de lipides

Outre son rôle dans les remaniements subis par les protéines de sécrétion et les protéines membranaires, le RE est le siège principal de synthèse des lipides membranaires dans la cellule d'eucaryote. Vu leur hydrophobicité, les lipides se forment contre les membranes cellulaires existantes et non dans la phase aqueuse du cytosol. La plupart des lipides sont synthétisés dans le RE, bien que certains se forment au contact d'autres membranes ; ensuite, ils sont transportés du RE à leur destination finale, soit au moyen de vésicules, soit au moyen de protéines, comme on le montrera plus loin et au chapitre 10.

brane catalysent leur réaction avec les précurseurs hydrosolubles (par exemple, la CDP-choline), mais cette disposition topographique fait que seul le feuillet cytosolique de la membrane du RE s'enrichit de nouveaux phospholipides (figure 9.17). La stabilité de la membrane exige dès lors qu'une partie des nouveaux phospholipides soit transférée à l'autre feuillet (luminal) de la bicouche du RE. Ce transfert n'est pas spontané, car il oblige la tête polaire de la molécule de phospholipide à franchir la zone apolaire de la bicouche ; aussi des chaperons de bascule (*flippases*) catalysent-ils la translocation rapide des phospholipides d'un feuillet à l'autre de la membrane du RE, favorisant une croissance équilibrée des deux feuillets de la bicouche.

Outre son rôle dans la synthèse des phospholipides à base de glycérol, le RE est aussi le site principal de synthèse de deux autres types de lipides membranaires, le cholestérol et les céramides (figure 9.18). Comme on le verra, un céramide est converti en glycolipide ou en sphingomyéline (seul phospholipide membranaire qui ne dérive pas du glycérol) dans l'appareil de Golgi. C'est donc dans le RE que s'effectue la synthèse, sinon des produits finals, du moins des précurseurs de tous les principaux lipides composant les membranes des cellules d'eucaryote.

Le RE lisse est abondant dans les types cellulaires particulièrement actifs dans le métabolisme lipidique ; comme, par exemple, les stéroïdes hormonaux se forment (à partir de cholestérol) dans le RE, on trouve une grande

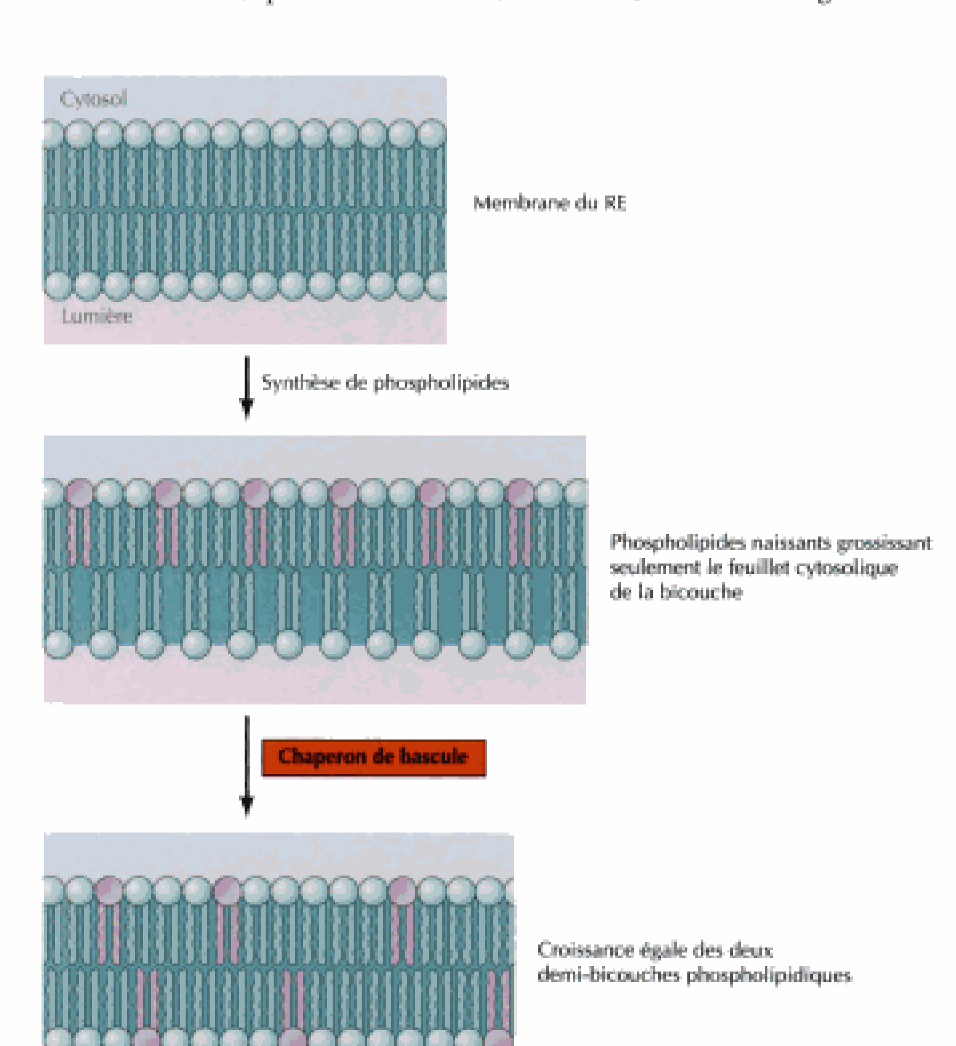


Figure 9.17
Translocation de phospholipides à travers la membrane du RE.
Comme les phospholipides se forment contre la face cytosolique de la membrane du RE, ils alimentent seulement le feuillet cytosolique de la bicouche ; ils sont ensuite livrés à l'autre feuillet par des chaperons de bascule de phospholipides (*flippases*), ce qui équilibre la croissance des moitiés de la bicouche phospholipidique.

Figure 9.18
Structure du cholestérol et d'un céramide. On a omis de dessiner les atomes d'hydrogène attachés aux carbones des cycles du cholestérol.

quantité de RE lisse dans les cellules productrices de stéroïdes, notamment celles du testicule et de l'ovaire. Ce RE lisse abonde aussi dans le foie, qui contient des enzymes métabolisant divers composés liposolubles ; pour détruire certains médicaments potentiellement dangereux (par exemple, le phénobarbital), ces enzymes de détoxification les transforment en composés hydrosolubles, facilement éliminés de l'organisme par le rein. Le RE lisse intervient donc à diverses étapes du métabolisme des lipides et des substances liposolubles.

Exportation de protéines et de lipides par le RE

Protéines et lipides empruntent la voie sécrétoire par vésicules de transport interposées, qui bourgeonnent de la membrane d'un organite pour aller se souder à la membrane d'un autre organite ; les molécules quittent donc le RE dans des vésicules nées du RE, qui vont se fondre dans la membrane du Golgi (figure 9.19). Les étapes suivantes de la voie sécrétoire font intervenir un transport par vésicules entre les divers compartiments du Golgi, puis du Golgi aux lysosomes ou à la membrane plasmique. Dans chaque cas, les protéines siégeant dans la lumière d'un organite sont emprisonnées dans la vésicule de transport bourgeonnante, puis libérées dans la lumière de l'organite receveur après la fusion de la vésicule. Protéines membranaires et lipides sont transportés de la même façon et il est remarquable que leur orientation topographique se conserve d'un organite bordé de membrane au suivant ; c'est ainsi que le domaine d'une protéine en contact avec la face cytosolique de la membrane du RE se retrouvera sur la face cytosolique du Golgi ainsi que de la membrane plasmique, alors que les domaines protéiques faisant saillie à la face luminale de la membrane du RE arriveront à la face luminale du Golgi, puis à l'extérieur de la cellule (voir figure 9.9).

Si la plupart des protéines passent du RE au Golgi, certaines protéines, au lieu de suivre la voie sécrétoire, restent dans le RE, notamment celles qui y exercent leur fonction (BiP, la peptidase du signal, l'isomérase des disulfures et d'autres enzymes mentionnés auparavant). Le choix entre l'exportation vers le Golgi ou la rétention dans le RE est donc le premier carrefour

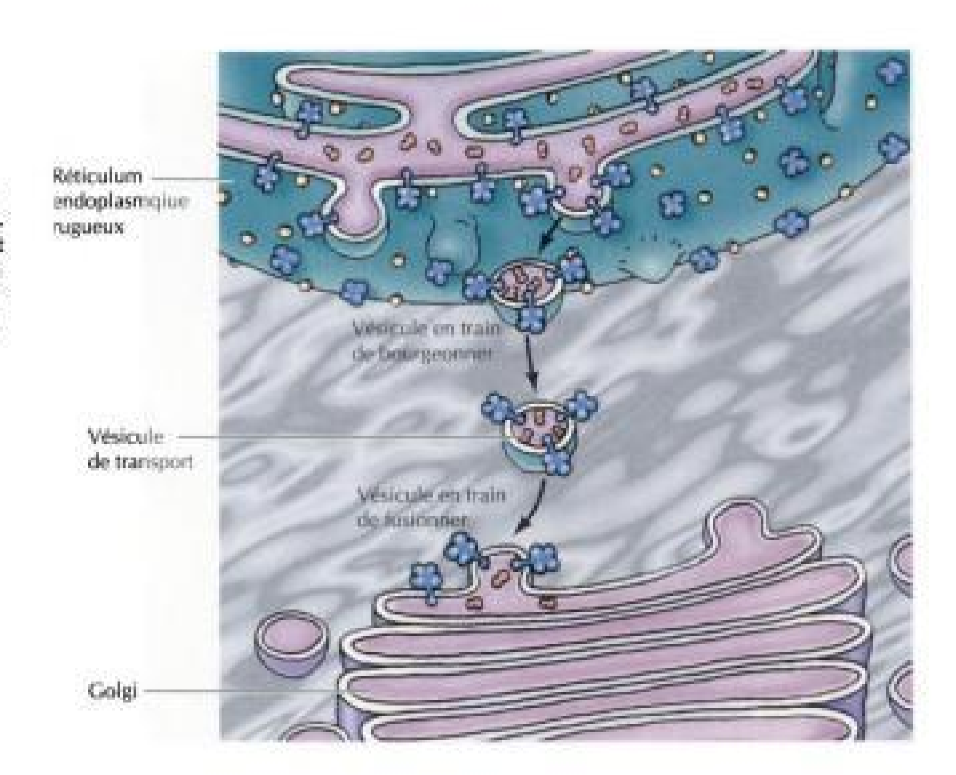


Figure 9.19
Transport du RE au Golgi par vésicules interposées. Protéines et lipides passent du RE au Golgi au moyen de vésicules de transport qui bourgeonnent de la membrane du RE avant de fusionner avec celle du Golgi. Les protéines de la lumière du RE sont emprisonnées dans des vésicules, puis libérées dans la lumière du Golgi. Les protéines membranaires gardent dans le Golgi l'orientation qu'elles avaient dans le RE.

rencontré par les protéines soumises au tri et à l'adressage corrects effectués par la voie sécrétoire. Les protéines vont rencontrer encore des aiguillages à chaque stade ultérieur de leur transport, tel que le choix d'être retenues dans le Golgi ou d'être acheminées au lysosome ou à la membrane plasmique ; dans chaque cas, des signaux d'adressage particuliers guideront la protéine vers sa destination correcte.

La discrimination entre protéine exportée et protéine retenue dans le RE est due à une séquence d'adressage qui marque sélectivement une protéine soit (1) pour passer dans le Golgi soit (2) pour rester dans le RE. Beaucoup de protéines restent dans la lumière du RE à cause de la séquence d'adressage -Lys-Asp-Glu-Leu- (KDEL, dans le code à une lettre) placée à leur bout carboxyle. Si on élimine cette séquence d'une protéine habituellement retenue dans le RE (par exemple BiP), la protéine mutée passe au Golgi puis est sécrétée dans le milieu. Inversement, quand on greffe une séquence KDEL au bout carboxyle d'une protéine habituellement sécrétée, on la force à rester dans le RE. La rétention de certaines protéines transmembranaires dans le RE est dictée de même par une courte séquence C-terminale portant deux résidus lysyle (séquence KKXX).

On s'étonnera du fait que les signaux KDEL et KKXX n'empêchent pas les protéines solubles du RE d'être emprisonnées dans des vésicules et amenées au Golgi ; c'est que ces signaux enclenchent la récupération sélective de ces protéines dans le Golgi et leur retour au RE par une voie de recyclage (figure 9.20). On a montré que les protéines pourvues des séquences KDEL ou KKXX se fixaient à des récepteurs de recyclage particuliers portés par la membrane du Golgi, avant d'être ramenées sélectivement au RE.

Le rôle de signal de rétention/récupération joué par les séquences KDEL et KKXX indique qu'il existe un flux général, non sélectif, de protéines le long de la voie de sécrétion allant du RE à la surface de la cellule. Ces signaux de rétention/récupération empêchent les protéines d'être emportées en vrac par ce flux et font en sorte que les protéines marquées restent dans le RE ; on constate aussi que les protéines destinées à l'exportation hors du RE sont sélectivement emprisonnées dans des vésicules de transport dirigées vers le Golgi. La sortie des protéines du RE serait donc dictée non seu-

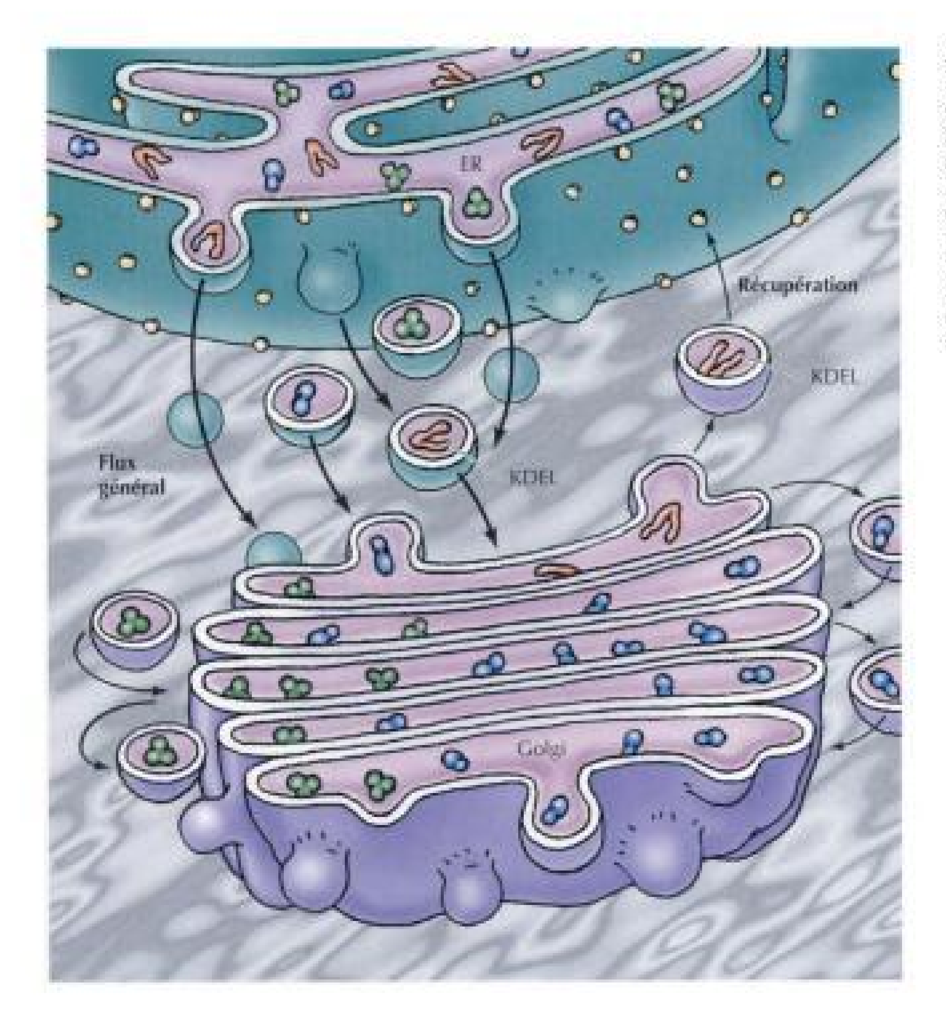


Figure 9.20
Récupération de protéines résidentes du RE. Les protéines qui doivent rester dans la lumière du RE portent la séquence -Lys-Asp-Glu-Leu- (KDEL) à leur bout carboxyle. Ces protéines sont emportées, sans discrimination, du RE vers le Golgi par le flux général de la voie sécrétoire, mais elles seront reconnues par un récepteur siégeant dans le Golgi et ramenées sélectivement dans le RE.

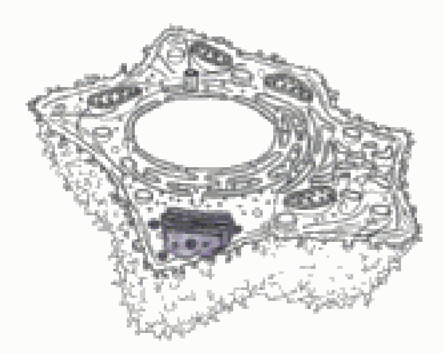
lement par des signaux de rétention/récupération, mais aussi par des signaux d'adressage qui guident sélectivement leur transport vers l'appareil de Golgi.

L'APPAREIL DE GOLGI

L'**appareil de Golgi**, ou **complexe de Golgi** sert d'usine à remodeler encore et à trier les protéines reçues du RE pour les aiguiller vers leurs sites définitifs : lysosome, membrane plasmique ou milieu extracellulaire. En outre, comme on l'a mentionné, le Golgi fabrique les glycolipides et les sphingomyélines. Dans la cellule végétale, l'appareil de Golgi sert aussi à synthétiser les polysaccharides complexes de la paroi cellulaire. Le Golgi intervient donc dans la maturation de tout une série de constituants cellulaires qui empruntent la voie sécrétoire.

Structure de l'appareil de Golgi

L'appareil de Golgi apparaît sous forme de sacs et de vésicules associées, limités par une membrane (figure 9.21). Un trait frappant du Golgi est sa polarité, tant structurale que fonctionnelle ; les protéines issues du RE y pénètrent par sa face *cis* (face d'entrée), convexe et tournée vers le noyau. Elles sont ensuite transportées à travers l'appareil de Golgi et en sortent par sa face *trans* (face de sortie) ; pendant leur traversée du Golgi, les protéines



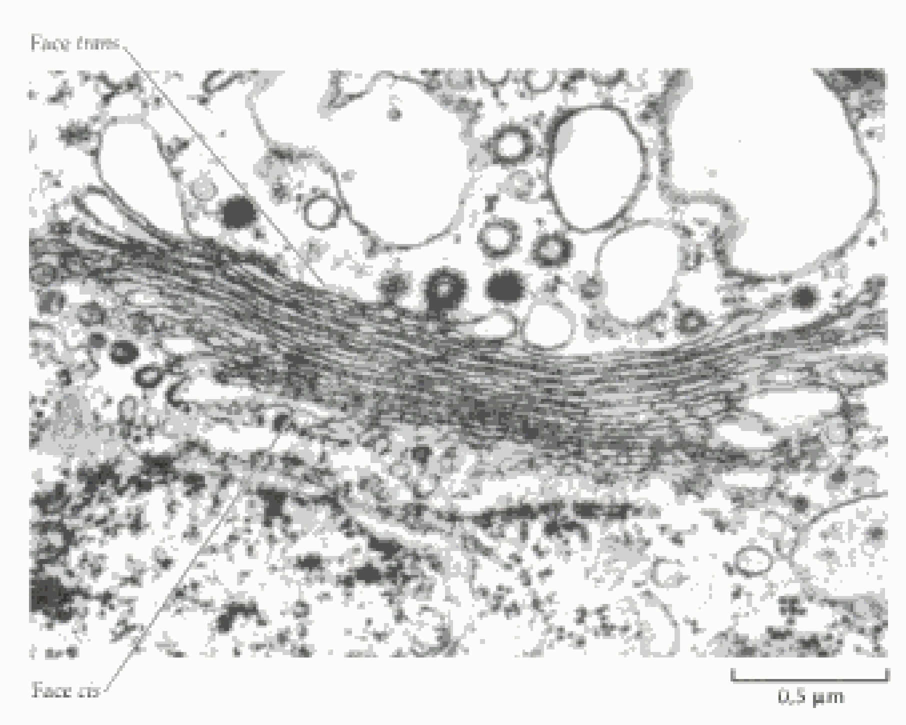


Figure 9.21
Micrographie électronique d'un appareil de Golgi. L'appareil de Golgi consiste en un empilement de citernes aplaties et de vésicules associées. Les protéines et les lipides issus du RE entrent par la face *cis* du Golgi et en sortent par la face *trans*. (Garry T. Cole/Biological Photo Service).

sont modifiées et triées pour être dirigées vers leur destination finale au sein de la cellule.

On a observé que divers événements de maturation et de tri se suivaient régulièrement dans des zones successives du Golgi ; aussi considère-t-on le Golgi comme une série de compartiments bien individualisés. Bien qu'on ignore le nombre de ces compartiments, le modèle le plus simple divise le Golgi en trois compartiments fonctionnels distincts : le **réseau du *cis-Golgi***, l'**empilement du Golgi** (où il peut exister plusieurs sous-compartiments) et le **réseau du *trans*-Golgi** (figure 9.22). Des vésicules de transport charrient les protéines d'un de ces compartiments au suivant pendant que leur maturation et leur tri s'effectuent. En outre, des tubules à paroi membranaire mettraient certaines citernes du Golgi en communication.

Les protéines pénètrent dans l'appareil de Golgi par le réseau du *cis*-Golgi, occupé surtout à recevoir les vésicules de transport issues du RE et à trier leur contenu. Les protéines assignées à résidence dans le RE sont alors reconnues et renvoyées au RE *via* la voie de recyclage dessinée dans la figure 9.20. D'autres protéines sont emmenées par les vésicules de transport dans l'empilement du Golgi, les citernes empilées du milieu du complexe de Golgi qui sont le siège de la plupart des activités métaboliques de cet organite. Des vésicules de transport emmènent ensuite les protéines remaniées, les lipides et les polysaccharides, de l'empilement du Golgi au réseau du *trans*-Golgi, où auront lieu les dernières étapes de la maturation des protéines. Le réseau du *trans*-Golgi sert alors de centre de tri et de répartition, dirigeant les molécules vers les lysosomes, la membrane plasmique ou le milieu extérieur.

Glycosylation des protéines dans le Golgi

Au sein du Golgi, les glycoprotéines subiront une modification de certaines chaînes glucidiques et la synthèse d'autres chaînes glucidiques. Un des nœuds de cette maturation est le remaniement des oligosaccharides greffés à N, qui furent greffés aux protéines dans le RE ; on a vu au début de ce chapitre que les protéines sont remaniées dans le RE par addition d'un oligosaccharide fait de 14 résidus glucidiques (voir figure 9.14) ; trois résidus

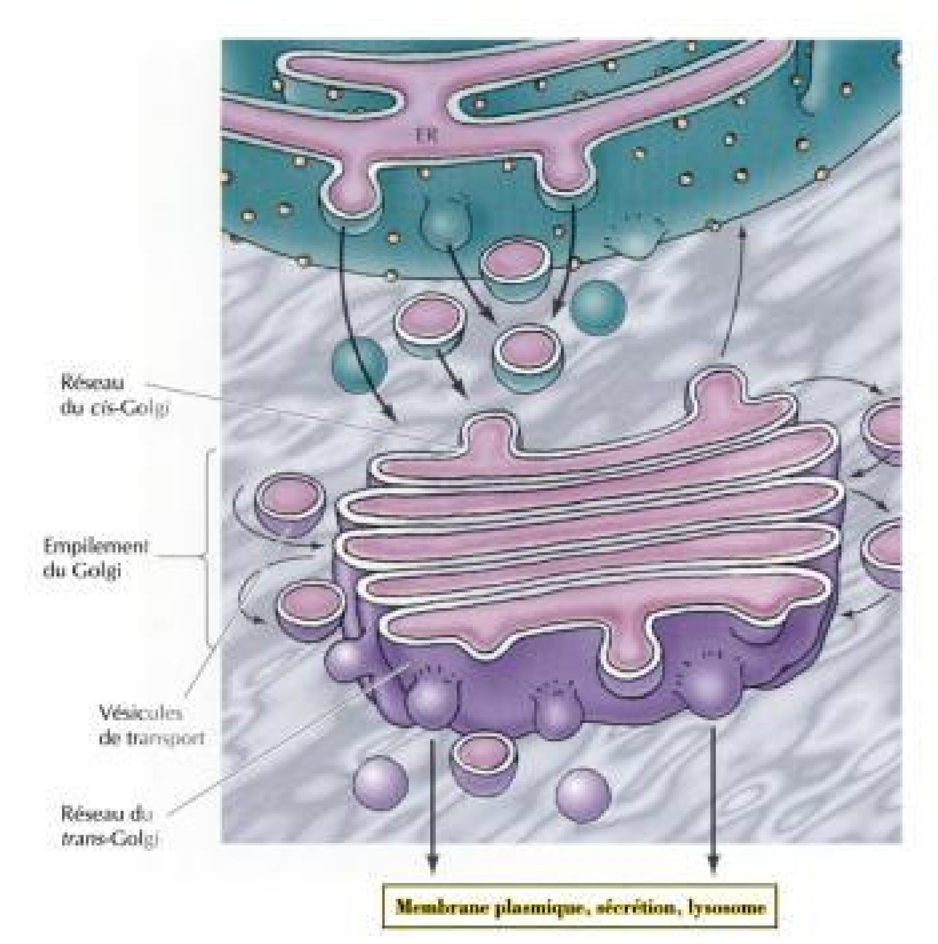


Figure 9.22
Zones de l'appareil de Golgi. Le réseau du *cis*-Golgi est le point d'arrivée des vésicules issues du RE et de retour des vésicules de la voie de recyclage. L'empilement golgien correspond aux citernes du milieu du complexe de Golgi ; c'est là que s'effectuent les principales modifications apportées aux protéines. Les protéines passent ensuite dans le réseau du *trans*-Golgi, où le processus de tri les répartit entre membrane plasmique, milieu extracellulaire ou lysosme.

glucosyle et un résidu mannosyle en sont éliminés avant que le polypeptide ne quitte le RE. Une fois celui-ci arrivé dans le Golgi, les oligosaccharides liés à N de ces glycoprotéines vont subir encore de profondes modifications.

Les oligosaccharides liés à N sont remaniés dans le Golgi par une série de réactions bien ordonnées (figure 9.23). La première modification frappant les protéines de sécrétion ou celles destinées à la membrane plasmique est l'amputation de trois résidus mannosyle supplémentaires ; ensuite vient l'addition d'une *N*-acétylglucosamine, l'élimination de deux mannoses supplémentaires puis l'addition d'un fucose et d'encore deux *N*-acétylglucosamines. Enfin, viennent s'ajouter à la chaîne trois galactoses et trois sialates, ces derniers ajoutés seulement dans le réseau du *trans*-Golgi. Comme on l'a mentionné au chapitre 7, telle glycoprotéine est modifi

Amputation de trois résidus mannosyle
Ajout d'un groupe *N*-acétylglucosamine
Amputation de deux autres résidus mannose
Ajout d'un résidu fucose et de 2 résidus *N*-acétylglucosamine
Ajout de trois résidus galactose
Ajout de trois résidus sialate

N-acétylglucosamine
Mannose
Galactose
Fucose
Sialate

Figure 9.23
Remodelage d'un oligosaccharide lié à N dans le Golgi. Les oligosaccharides liés à N dans les protéines sortant du RE sont remodelés dans le Golgi selon un ordre de réactions bien défini.

ces résidus échapperont à tout remaniement ultérieur. Ces résidus mannosyl-6-phosphate sont spécifiquement reconnus par un récepteur de mannosyl-6-phosphate du réseau du *trans*-Golgi, récepteur qui guidera ces protéines jusqu'au lysosome.

La phosphorylation de résidus mannose est donc une étape cruciale de l'adressage des protéines lysosomiales à leur site intracellulaire correct ; la spécificité de ce processus est déterminée par l'enzyme qui catalyse l'étape initiale de la séquence, à savoir le greffage de résidus *N*-acétylglucosamine-6-phosphate aux protéines lysosomiales. Cet enzyme reconnaît un déterminant structurel présent sur les protéines lysosomiales, non sur celles destinées à la membrane plasmique ou au milieu extracellulaire ; ce déterminant

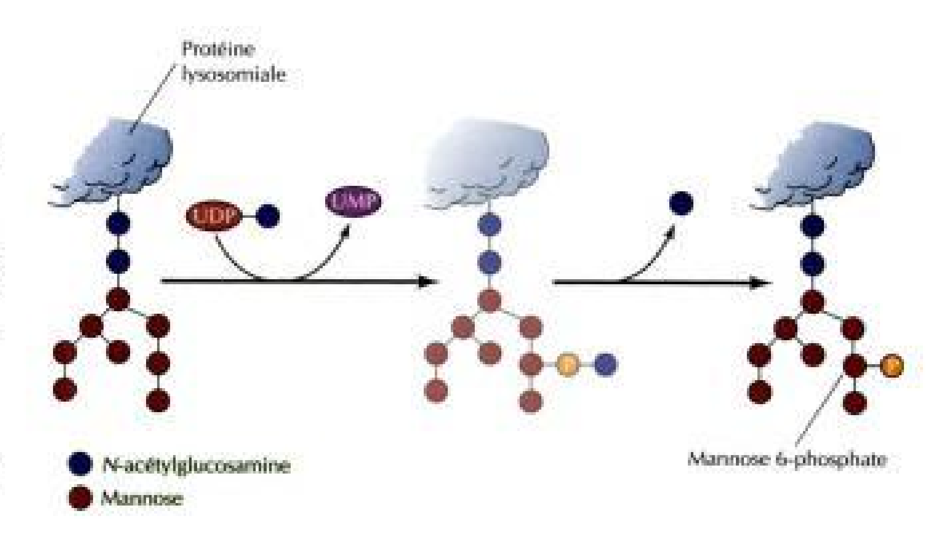


Figure 9.24
Marquage d'une protéine destinée au lysosome par phosphorylation d'un résidu mannosyle. Les protéines devant s'incorporer au lysosome sont spécifiquement reconnues et modifiées par addition d'un groupe phosphoryle à la position 6 de certains résidus mannosyle. Dans une première étape, le groupe *N*-acétylglucosamine 6-phosphate de la UDP-*N*-acétylglucosamine est transféré au résidu mannosyle ; le groupe *N*-acétylglucosamine est ensuite éliminé, laissant un groupe phosphoryle attaché au mannose.

n'est pas une simple séquence d'acides aminés, mais consiste en la juxtaposition de séquences d'acides aminés appartenant à diverses régions de la chaîne polypeptidique reployée. Contrairement aux séquences signal qui guident la translocation des protéines vers le RE, le déterminant de reconnaissance qui impose la phosphorylation des mannoses et, ce faisant, l'acheminement des ces protéines aux lysosomes, dépend de la conformation tridimensionnelle de la protéine reployée ; ces déterminants sont appelés **sceaux de signalisation** (*signal patches*), pour les distinguer des signaux d'adressage linéaires que nous avons décrit au début de ce chapitre.

Certaines protéines sont remaniées par addition de glucides à des chaînes latérales de résidus sérine et thréonine siégeant dans certaines séquences singulières d'acides aminés (*O*-glycosylation)(voir figure 7.28). Ces remaniements ont lieu dans l'appareil de Golgi, par addition successive de résidus monosaccharidiques ; la sérine ou la thréonine reçoit d'habitude directement un résidu *N*-acétylgalactosamine, auquel d'autres sucres viennent s'ajouter ; parfois, ces résidus sont modifiés par addition d'un groupe sulfate.

Métabolisme des lipides et des polysaccharides dans le Golgi

Outre son rôle dans le remodelage et le tri des glycoprotéines, l'appareil de Golgi intervient dans le métabolisme des lipides, notamment dans la synthèse des glycolipides et de la sphingomyéline. Rappelons que les glycérophospholipides, le cholestérol et les céramides sont synthétises dans le RE ; l'appareil de Golgi utilise ensuite ces céramides pour construire les glycolipides et les sphingomyélines (figure 9.25). Les sphingomyélines (seuls phospholipides membranaires dépourvus de glycérol) se forment par transfert du groupe phosphorylcholine d'une phosphatidylcholine à un céramide.

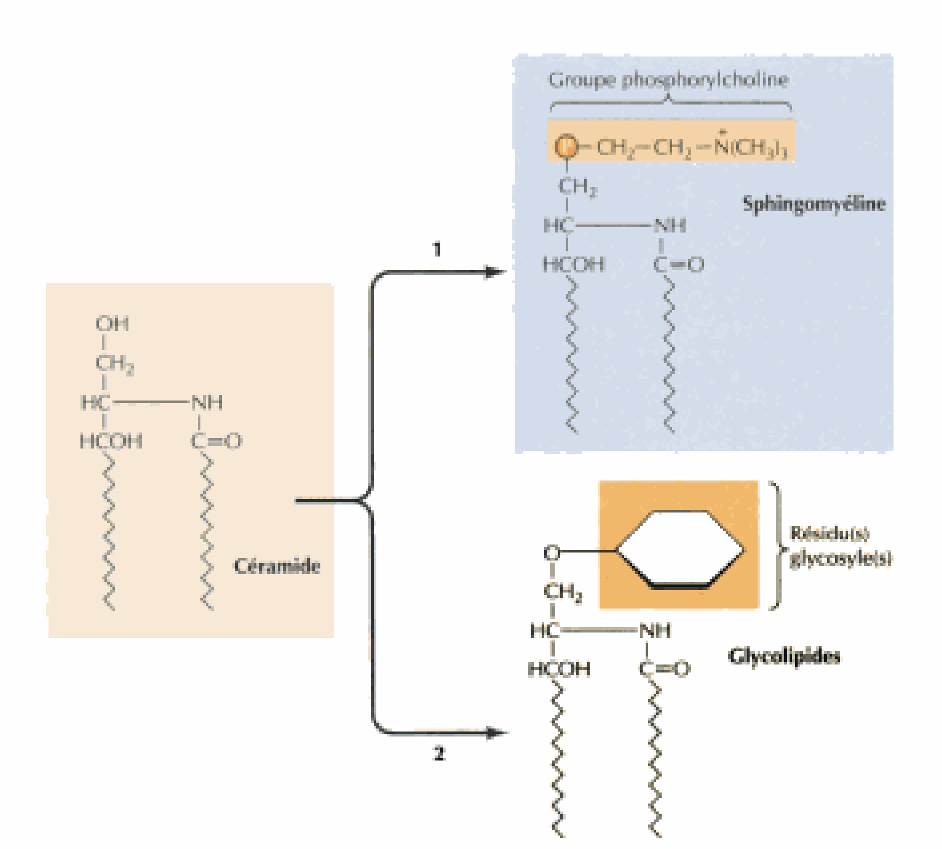


Figure 9.25
Synthèse de sphingomyéline et de glycolipides. Un céramide, synthétisé dans le RE, est transformé soit en sphingomyéline (un phospholipide) soit en glycolipides dans l'appareil de Golgi. Au cours de la première réaction, le groupe phosphorylcholine d'une phosphatidylcholine est transféré au céramide ; sinon, divers glycolipides se forment par addition d'au moins un glucide (par exemple, le glucose).

D'autre part, l'ajout de glucides à un céramide produit tout une série de glycolipides.

La sphingomyéline se forme à la surface luminale du Golgi, mais le glucose est ajouté au céramide sur sa face cytosolique ; le céramide doit alors basculer et les glucides suivants lui seront ajoutés sur la face luminale de la membrane du Golgi. Comme la sphingomyéline ni les glycolipides ne sont capables de se déplacer à travers la membrane, on les trouvera seulement du côté luminal de la bicouche du Golgi. A la suite du transport par les vésicules, ils siégeront dans le feuillet externe de la membrane plasmique, leur tête polaire émergeant de la surface de la cellule. On verra au chapitre 12 que la partie oligosaccharidique de certains glycolipides est un important marqueur de surface dans la reconnaissance de cellule à cellule.

Dans les cellules végétales, l'appareil de Golgi remplit une tâche supplémentaire, à savoir servir de support à la synthèse des polysaccharides complexes de la paroi cellulaire ; comme nous l'indiquerons aussi au chapitre 12, la paroi cellulaire comporte trois types principaux de polysaccharides ; celui qui domine, la cellulose, est un polymère linéaire simple de résidus glucosyle, synthétisé à la surface cellulaire par des enzymes de la membrane plasmique. Par contre, les autres polysaccharides (hémicelluloses et pectines) sont des molécules complexes, ramifiées, synthétisées dans l'appareil de Golgi puis amenées à la surface cellulaire par des vésicules. La synthèse de ces polysaccharides pariétaux est une fonction cellulaire majeure, vu que la synthèse de polysaccharides mobilise jusqu'à 80 % de l'activité métabolique du Golgi des cellules végétales.

Tri et exportation de protéines par l'appareil de Golgi

Au départ du Golgi, protéines, lipides et polysaccharides gagnent leur destination en suivant la voie sécrétoire. Ce processus comprend le tri et la répartition des protéines à différentes sortes de vésicules de transport, qui bourgeonnent à la surface du réseau du *trans*-Golgi et livrent leur contenu aux endroits appropriés de la cellule (figure 9.26). En l'absence de signal d'adressage particulier, les protéines sont emportées vers la membrane plasmique, par un flux général qui déplace les protéines en vrac, du RE vers le Golgi puis vers la surface cellulaire. Cette voie rend compte de l'incorporation de nouvelles protéines et de nouveaux lipides à la membrane plasmique ainsi que de la sécrétion continue de protéines par la cellule. Les protéines n'échappent à ce flux général que si elles sont spécifiquement marquées pour d'autres destinations, par exemple le lysosome.

Pour que les protéines fonctionnant dans le Golgi soient retenues dans cet organite, elles doivent échapper au flux général de la voie sécrétoire. Il semble que cette rétention de protéines membranaires dans le Golgi soit due à leur domaine transmembranaire ; la plupart des protéines de la membrane du Golgi portent en effet de relativement courtes hélices α transmembranaires, de seulement 15 résidus d'acide aminé ; ces courtes régions transmembranaires contribueraient à maintenir ces protéines dans le Golgi. En outre, comme c'est le cas des séquences KDEL et KKXX des protéines résidant dans le RE, des signaux portés par les queues cytoplasmiques de certaines protéines du Golgi permettent à la cellule de récupérer ces protéines des divers compartiments situés en aval dans la voie de sécrétion.

La voie du flux général, présente dans toute cellule, assure une sécrétion continue, constitutive, de protéines, mais certaines cellules possèdent aussi une voie sécrétoire soumise à régulation, dans laquelle des protéines particulières sont sécrétées sur commande d'un signal extérieur. C'est la cas de la libération d'hormones par les cellules endocrines, de l'émission de neuromédiateurs par les neurones et de la libération d'enzymes digestifs par les cellules acineuses pancréatiques, présentée au début de ce chapitre (voir figure 9.2). Dans le réseau du *trans*-Golgi, les protéines sont aiguillées vers

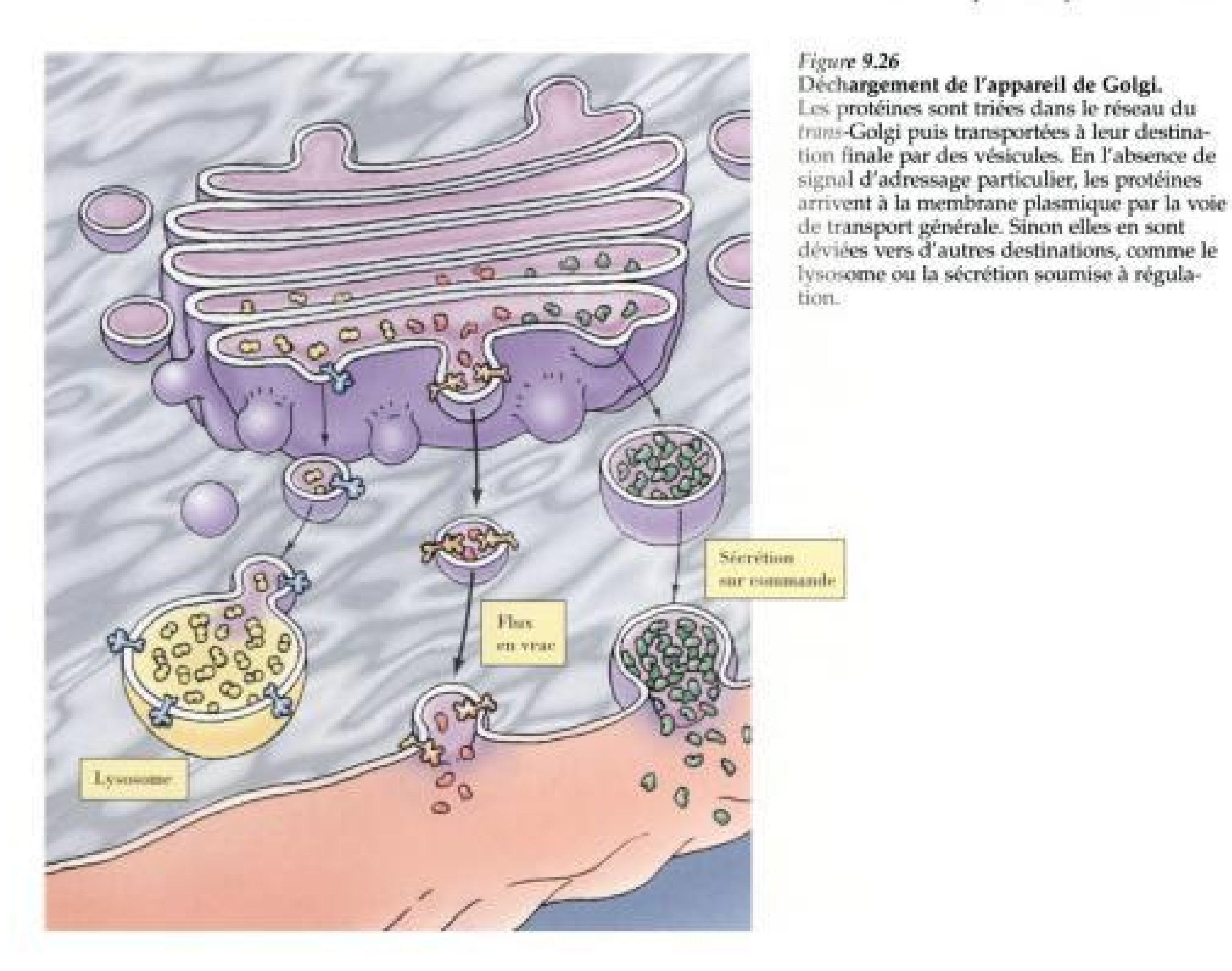


Figure **9.26**
Déchargement de l'appareil de Golgi. Les protéines sont triées dans le réseau du *trans*-Golgi puis transportées à leur destination finale par des vésicules. En l'absence de signal d'adressage particulier, les protéines arrivent à la membrane plasmique par la voie de transport générale. Sinon elles en sont déviées vers d'autres destinations, comme le lysosome ou la sécrétion soumise à régulation.

la voie sécrétoire soumise à régulation et y sont emballées dans des vésicules sécrétoires spécialisées ; celles-ci sont plus volumineuses que les autres vésicules de transport et conservent leur charge jusqu'à ce que des signaux singuliers enclenchent leur fusion à la membrane plasmique. Les enzymes digestifs produits par les cellules acineuses du pancréas, par exemple, s'accumulent dans des vésicules sécrétoires jusqu'à ce que l'arrivée d'aliments dans l'estomac et l'intestin grêle déclenche leur sécrétion. La canalisation de protéines vers la voie sécrétoire soumise à régulation obéirait à la reconnaissance d'étiquettes de signalisation présentes sur tout une série de protéines aiguillées vers cette voie. Ces protéines se concentrent sélectivement dans le réseau du *trans*-Golgi et quittent l'organite au moment où les vésicules sécrétoires bourgeonnent à sa surface.

Une complication supplémentaire du transport des protéines vers la membrane plasmique se présente dans les cellules épithéliales, qui sont polarisées au sein des tissus. La membrane plasmique de ces cellules présente deux régions différentes, un **domaine apical** et un **domaine basolatéral**, pourvus chacun de protéines particulières à son fonctionnement ; ainsi la membrane apicale des cellules de l'épithélium intestinal regarde la lumière

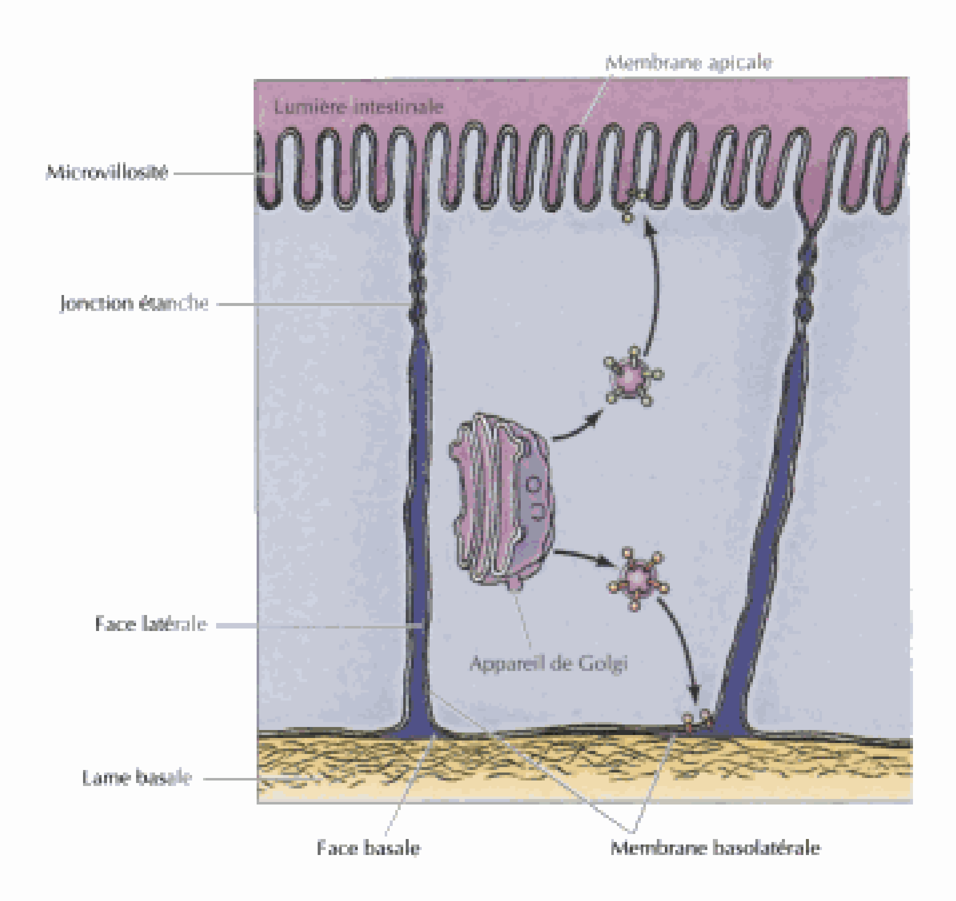


Figure 9.27
Transport à la membrane plasmique d'une cellule polarisée. La membrane plasmique d'une cellule polarisée comporte un domaine apical et un domaine basolatéral. Dans cette cellule de l'épithélium intestinal, la surface apicale est au contact de la lumière intestinale, les faces latérales accolées à leurs voisines et la face basale ancrée à la matrice extracellulaire (la lame basale). La membrane apicale se caractérise par la présence de microvillosités, qui favorisent l'absorption alimentaire en augmentant la surface active. Le réseau du *trans*-Golgi enverra telle protéine s'implanter dans la membrane du pôle apical, telle autre dans celle du pôle basal. En empêchant que les protéines ne diffusent d'un domaine membranaire au voisin, les jonctions étanches soudant deux cellules conjointes assurent l'intégrité de leurs membranes apicales et basolatérales.

du tube digestif et sert à absorber efficacement les aliments ; le reste de la cellule est bordé de la membrane basolatérale (figure 9.27). Dans certains types d'épithélium, le réseau du *trans*-Golgi trie les protéines membranaires pour les envoyer soit à l'un soit à l'autre de ces domaines de la membrane plasmique ; si on ne connaît pas encore bien les signaux mis en jeu, on sait qu'une ancre GPI entraîne la protéine dans le domaine apical.

L'acheminement de protéines au lysosome est la mieux caractérisée des voies qui évitent la voie du flux général. Comme on l'a mentionné, les protéines lysosomiales de la lumière du Golgi reçoivent un marqueur mannose 6-phosphate, formé par modification d'un oligosaccharide lié à N peu après leur arrivée dans le Golgi. Un récepteur particulier ancré dans la membrane du réseau du *trans*-Golgi reconnaît alors ces résidus mannosyl-6-phosphate. Le complexe, formé alors par le récepteur et l'enzyme lysosomial, s'accumule dans des vésicules de transport destinées au lysosome. La marque des protéines de membrane lysosomiale réside non dans un groupe mannosyl-6-phosphate, mais dans une séquence présente dans leur queue cytoplasmique.

Dans les cellules de levure et de plante, dépourvues de lysosome, les protéines issues du Golgi ont encore une autre destination, à savoir la **vacuole** (figure 9.28). Dans ces cellules, la vacuole remplit le rôle du lysosome ainsi que plusieurs autres tâches, comme la mise en réserve d'aliments et le maintien de la pression de turgescence et de l'équilibre osmotique. Contrairement à l'aiguillage vers le lysosome, les protéines sont adressées à la vacuole par de courtes séquences peptidiques et non par des marqueurs glucidiques. On a trouvé un signal responsable de l'adressage à la vacuole de levure ; c'est la séquence -Gln-Arg-Pro-Leu-, mais il semble que d'autres protéines vacuolaires portent d'autres signaux d'aiguillage.

chercheurs ont imaginé trois genres d'expérience, à savoir : (1) isoler des mutants de levure défectifs dans le transport et le tri des protéines, (2) reconstituer le transport vésiculaire dans des systèmes acellulaires et (3) étudier les vésicules synaptiques, siège d'une sécrétion sur commande de neuromédiateurs par le neurone. Chacun de ces système convient pour saisir tel aspect du processus de transport plutôt qu'un autre, mais il est important de remarquer que les résultats de ces trois stratégies ont convergé, montrant qu'on retrouve les mécanismes moléculaires gouvernant la sécrétion dans des cellules aussi différentes que les levures et les neurones de mammifère.

Comme il est arrivé dans d'autres domaines de la biologie cellulaire, les levures se sont révélées un matériau de choix pour étudier la voie de sécrétion, puisqu'elles se prêtent si bien à l'analyse génétique. Randy Schekman [redacted]

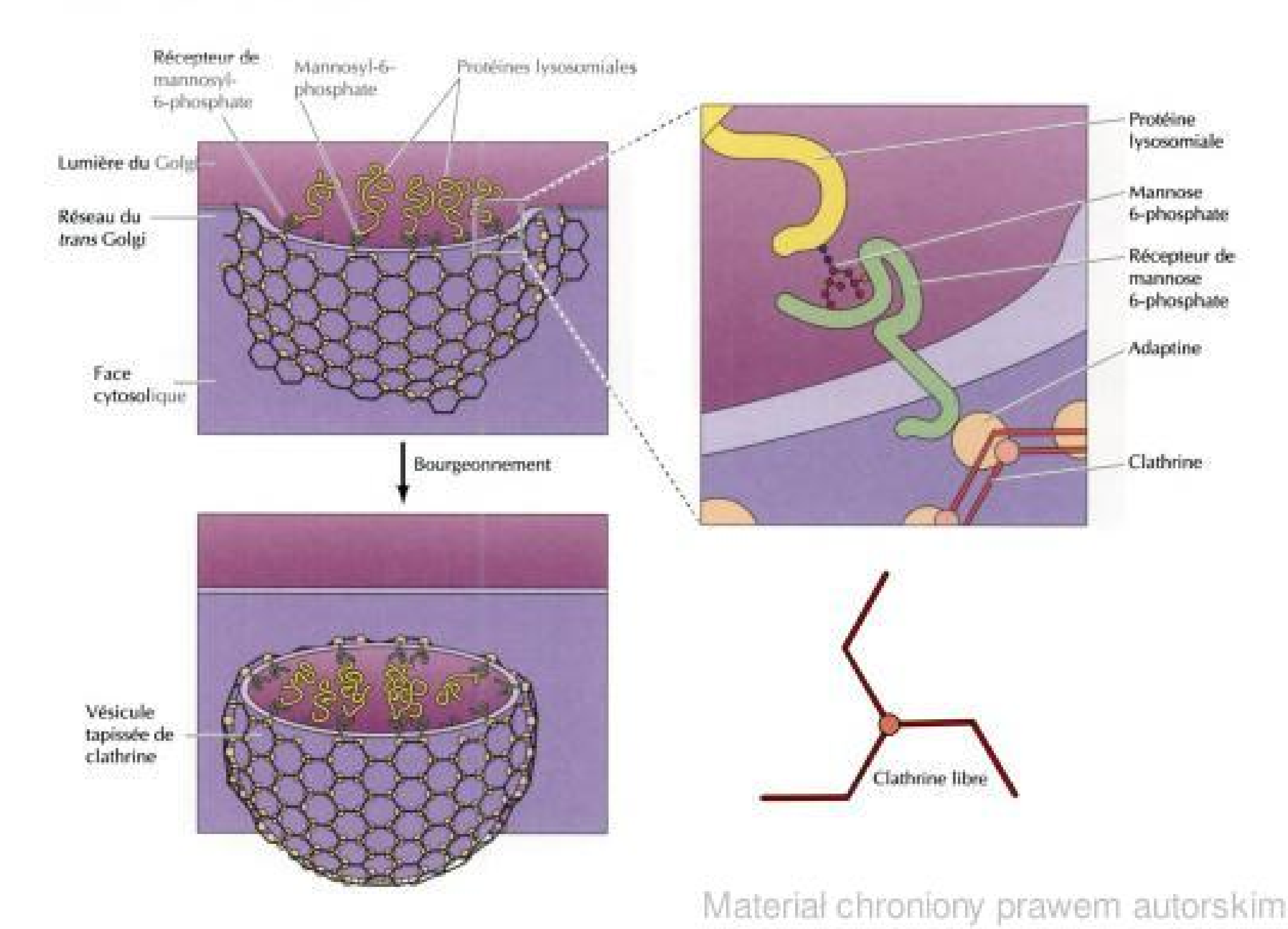
Cellule mutante infectée par un virus

Protéines de tapissage et bourgeonnement vésiculaire

Tout transport vésiculaire commence par un bourgeonnement membranaire. La face cytoplasmique des vésicules de transport est couverte de protéines et on pense que l'assemblage de ce manteau protéique suffit à enclencher le bourgeonnement de vésicules, car il modifie la conformation de la membrane. On a trouvé trois sortes de vésicules tapissées, fonctionnant chacune dans un type particulier de transport vésiculaire. Les premières décrites furent les **vésicules tapissées de clathrine**, responsables de la capture de molécules extracellulaires par endocytose au niveau de la membrane plasmique (voir chapitre 12) ainsi que du transport de molécules entre le réseau du *trans*-Golgi et le lysosome. On a identifié ensuite deux autres types de vésicules tapissées, qui bourgeonnaient sur les membrane du RE et du complexe de Golgi ; on les appelle **vésicules dépourvues de clathrine,** ou **vésicules tapissées de COP** (COP, pour *coat protein*) ; les vésicules tapissées de COPI bourgeonnent de l'appareil de Golgi, celles qui sont tapissées de COPII du réticulum endoplasmique. Les vésicules tapissées de COPII transportent leur charge du réticulum endoplasmique au Golgi ; les étapes du transport assuré par les vésicules tapissées de COPI ne sont pas clairement définies : ces vésicules feraient la navette entre les citernes du Golgi, retourneraient du Golgi au RE ou effectueraient d'autres types de transport.

Le manteau des vésicules tapissées de clathrine comporte deux types de protéines, qui se joignent sur la face cytosoliques des membranes (figure 9.30). La **clathrine** joue un rôle structural, car elle vient former un réseau en forme de panier qui déforme la membrane et pousse au bourgeonnement de vésicules. L'attachement de la clathrine à la membrane se fait par l'in-

Figure 9.30
Incorporation de protéines lysosomiales à des vésicules tapissées de clathrine. Les protéines destinées au lysosome sont marquées d'un résidu mannosyl-6-phosphate, qui va se lier à un récepteur de mannosyl-6-phosphate siégeant sur le réseau du *trans*-Golgi. Ce récepteur occupe toute l'épaisseur de la membrane golgienne et sert à séquestrer les adaptines cytosoliques, qui à leur tour capturent la clathrine. La clathrine comporte trois chaines protéiques qui se joignent pour former un réseau en forme de panier, lequel déforme la membrane et enclenche la fusion de la vésicule.



termédiaire d'une autre classe de protéines, appelées **adaptines**. Telle adaptine provoque l'assemblage du manteau de clathrine sur la membrane plasmique, telle autre sur le réseau du *trans*-Golgi. Ce sont les adaptines qui choisissent les molécules à incorporer dans les vésicules ; ainsi, l'adaptine en jeu dans le bourgeonnement sur le réseau du *trans*-Golgi séquestre la portion cytosolique du récepteur de mannosyl-6-phosphate, et ce faisant, attire les protéines lysosomiales dans des vésicules tapissées de clathrine.

Le manteau des vésicules tapissées de COPI et COPII se compose d'autres complexes de protéines. Certains composants du manteau COPI entrent en interaction avec le motif KKXX responsable de la récupération des protéines du RE qui sont passées au Golgi, en accord avec le rôle attribué aux vésicules tapissées de COPI, à savoir retourner du Golgi au RE. Bien que les protéines du manteau des vésicules tapissées de COPI soit moins bien caractérisées que ne le sont clathrine ou adaptines, on pense que les composants de COPI et de COPII remplissent des tâches analogues à celles de ces deux protéines dans le bourgeonnement vésiculaire.

Le bourgeonnement, sur le réseau du *trans*-Golgi, de vésicules tapissées de clathrine et de celles tapissées de COPI fait aussi intervenir une protéine séquestrant GTP, appelée **ARF** (pour *ADP-ribosylation factor*). On s'est intéressé à ARF pour sa parenté avec les protéines Ras, étudiées en détail parce qu'elles sont des oncogènes présents dans les cancers humains ; comme on l'a dit au chapitre 7, les protéines Ras appartiennent au grand groupe des protéines (dont plusieurs facteurs de transcription en jeu dans la synthèse protéique) dont l'activité est pleine ou nulle selon qu'elles ont fixé GTP ou GDP. D'autres recherches ont révélé que ARF intervient dans la sécrétion ; sous sa forme liée à GTP, il s'associe notamment aux mem-

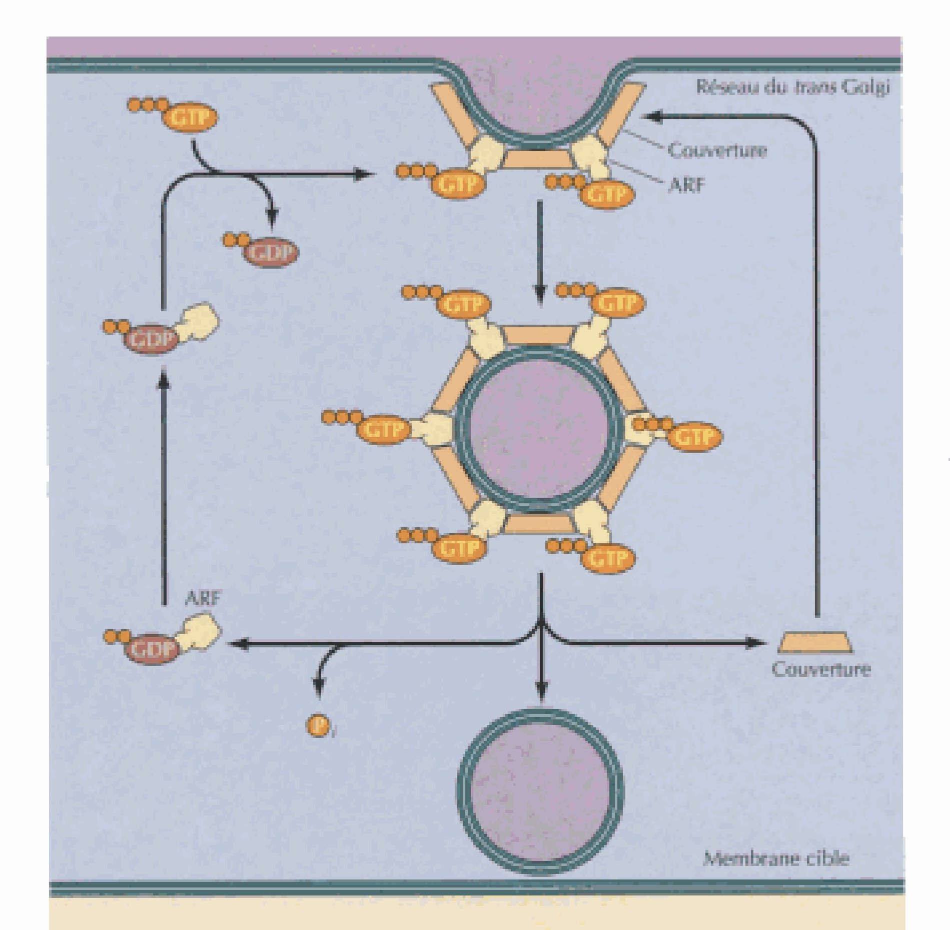


Figure 9.31
Rôle de ARF dans la formation de vésicules tapissées de COP.
ARF passe d'une forme portant GTP à une forme portant GDP. Quand il porte GTP, ARF se lie à la membrane du réseau du *trans*-Golgi et provoque l'attachement des protéines de tapissage COP (*coatomer*, couverture). L'hydrolyse en GDP du GTP lié fait changer ARF d'état, ce qui enclenche le démembrement du tapis, puis la fusion de la vésicule à la membrane cible. Le ARF chargé de GDP est reconverti en ARF-GTP sous l'action d'une protéine de la membrane golgienne qui catalyse l'échange de GDP contre GTP ; la couverture est de nouveau prête à s'assembler.

branes du Golgi et est requis pour que les composants du manteau COPI ou les adaptines de clathrine viennent s'y fixer (figure 9.31). Après bourgeonnement de la vésicule, la protéine ARF hydrolyse alors son groupe GTP en GDP, ce qui détache la protéine tapissante de la membrane de la vésicule.

D'autres protéines fixant GTP et apparentées à Ras seraient aussi en jeu dans le processus de sécrétion : citons celles qu'on identifie par analyse génétique chez les levures ainsi qu'une trentaine de protéines apparentées à Ras (les protéines Rab) impliquées dans le transport vésiculaire dans les cellules de mammifère. SAR1, une des protéines de levure, joue un rôle identique à celui que remplit la protéine ARF dans le bourgeonnement des vésicules tapissées de COPI et naissant du RE. On pense que d'autres protéines fixant GTP, comme les protéines Rab, sont plutôt des modulateurs de la fusion vésiculaire, un sujet auquel nous arrivons.

Fusion de vésicules

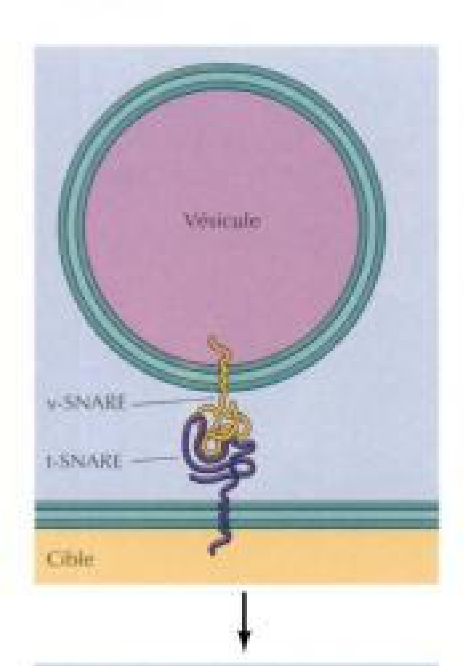
La fusion d'une vésicule avec sa cible met en jeu deux types d'événements. La vésicule de transport doit d'abord reconnaître spécifiquement la membrane cible appropriée ; une vésicule chargée d'enzymes lysosomiaux, par exemple, doit livrer son contenu dans le lysosome. Ensuite, la vésicule et la membrane cible doivent fusionner, avec déchargement du contenu de la vésicule dans l'organite cible. On pense que la reconnaissance particulière d'une cible par une vésicule est due à des interactions entre membres de paires singulières de protéines transmembranaires. La fusion finale de la vésicule à la membrane cible est l'affaire de protéines générales de fusion.

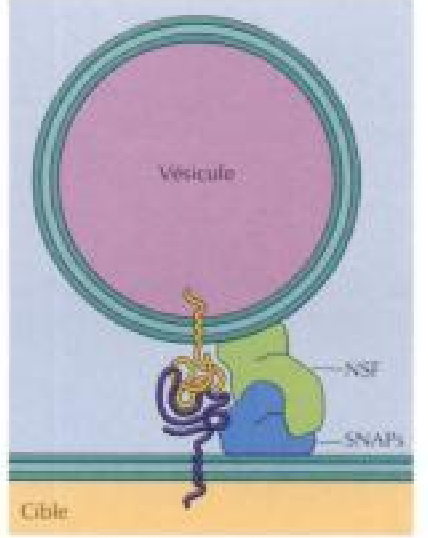
Certaines protéines impliquées dans la fusion vésiculaire furent identifiées d'abord par le groupe de James Rothman, à la suite d'analyse biochimique de systèmes de transport vésiculaire reconstitués à partir d'extraits de cellules de mammifères (voir figure 9.29). La première protéine de ce genre fut appelée NSF (pour *N*-ethylmaleimide-sensitive *f*usion) ; c'est une protéine cytosolique soluble qui s'attache aux membranes sous forme de complexe avec d'autres protéines appelées SNAP (pour *s*oluble *N*SF *a*ttachement *p*rotein). Les NSF et les SNAP isolées de cellules de mammifère ont leur contrepartie chez la levure ; d'autres travaux ont montré que ces protéines prennent part à tout une série d'événements de fusion vésiculaire, notamment dans le transport du RE au Golgi, dans le va-et-vient entre les compartiments du Golgi, dans le transport allant du Golgi à la membrane plasmique et dans la fusion des vésicules synaptiques aux terminaisons neuronales. Il semble donc que les protéines NSF et SNAP fassent partie d'une machinerie générale de fusion.

D'autres expériences ont conduit l'équipe de Rothman à proposer un modèle général qui rende compte de la spécificité de la fusion vésiculaire, à savoir que les NSF et SNAP se fixent à des familles particulières de récepteurs membranaires appelés récepteurs de SNAP, ou SNARE. Selon cette hypothèse des **SNARE**, la spécificité d'une fusion vésiculaire dépend de l'interaction spécifique entre une SNARE vésiculaire (v-SNARE) donnée et une autre SNARE déterminée de la membrane cible (t-SNARE). Dès qu'une vésicule a touché sa cible spécifique, le complexe SNARE recrute des NSF et des SNAP, entraînant la fusion de la vésicule dans la membrane cible.

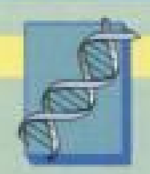
Cette hypothèse fut élaborée dès qu'on eut isolé des protéines SNARE du cerveau de bœuf en se basant sur leur pouvoir à s'attacher à un complexe protéique formé de NSF et de SNAP ; notons ici que les SNARE isolées selon cette stratégie s'avérèrent être des protéines dont l'attachement aux synapses avait déjà été démontré. En outre, l'une de ces SNARE faisait partie de la membrane des vésicules synaptiques (une v-SNARE) alors qu'une autre appartenait à la membrane plasmique du neurone (une t-SNARE) ; le gène de ces SNARE était de surcroît apparenté à une série de gènes identifiés déjà comme mutants de sécrétion chez la levure, remarquables parce

Figure 9.32
Hypothèse des SNARE. La reconnaissance d'une membrane par une vésicule est due à une association entre des paires singulières constituées d'une protéine v-SNARE et d'une protéine t-SNARE siégeant respectivement sur une vésicule et sur une membrane. Le complexe de ces SNARE attire alors des protéines de fusion générales, à savoir NSF et des SNAP, et entraîne la fusion des deux membranes.





MÉDECINE MOLÉCULAIRE



Maladie de Gaucher

La maladie

La maladie de Gaucher est la plus commune des maladies de surcharge lysosomiale, dues au défaut qu'ont les lysosomes de ne plus détruire les substances importées ; ces substances s'accumulant, les lysosomes cellulaires augmentent en taille et en nombre, entraînant un dysfonctionnement cellulaire et une pathologie typique dans certains organes. La maladie de Gaucher est le plus fréquente dans la population juive, environ un individu sur 2.500 est atteint. Il existe trois variétés de cette maladie, selon sa sévérité et l'atteinte du système nerveux. Dans le type le plus courant (type I), le système nerveux est indemne ; les symptômes consistent en hépato- et splénomégalie, avec lésions osseuses. Beaucoup de patients présentant cette forme de la maladie en souffrent à peine et ont une espérance de vie normale. Les formes les plus sévères (types II et III) sont plus rares et se rencontrent à la fois chez les populations juives et non-juives. Le type le plus grave est le type II, car il frappe une partie importante du système nerveux dès l'enfance et mène à une mort prématurée. Le type III, intermédiaire en gravité entre le type I et le type II, se caractérise par une apparition des symptômes nerveux (dont démence et spasticité) vers l'âge de dix ans.

Bases moléculaire et cellulaire

La maladie de Gaucher est due au déficit d'un enzyme lysosomial, la glucocérébrosidase, qui catalyse l'hydrolyse des glucocérébrosides en glucose et céramides (voir figure). On a découvert ce déficit enzymatique en 1965 et le gène responsable fut cloné en 1985. Depuis cette époque, on a trouvé plus de 30 types de mutation menant à la maladie de Gaucher. Il est remarquable qu'on puisse prévoir la gravité de la maladie d'après la nature de la mutation en cause ; ainsi, les patients dont la mutation consiste en la substitution relativement conservatoire d'une sérine à la place d'une asparagine souffrent d'une maladie de type I, alors que les patients chez lesquels la mutation consiste en la substitution d'une leucine par une proline témoignent d'une plus grande déficience en enzyme et sont atteints par les types II ou III de la maladie.

Sauf dans les types II et III, rares, de la maladie de Gaucher, les seules cellules atteintes sont les macrophages. Comme leur rôle est d'éliminer par phagocytose les cellules âgées et endommagées, les macrophages ingèrent continuellement une grande quantité de lipides, qui sont normalement détruits dans les lysosomes. Ainsi, la phagocytose par les macrophages de la rate et du foie humains arrive à éliminer jusqu'à 10^{11} globules rouges par jour. Le manque de glucocérébrosidase se marque donc particulièrement dans les macrophages de ces organes, ce qui cadre avec les manifestations précoces d'atteinte de la rate et du foie dans ces cas de maladie de Gaucher.

Prévention et traitement

La maladie de Gaucher est l'exemple même d'une maladie susceptible d'une thérapie de remplacement : on administre un enzyme qui pallie le déficit du patient. Cette approche au traitement des maladies de surcharge lysosomiale fut proposée dans les années '60 par Christian de Duve, avec l'idée que les enzymes administrés par voie extérieure seraient captés par endocytose et transportés aux lysosomes. Dans le type I de la maladie de Gaucher, cette approche est très encourageante, car la seule cellule cible est le macrophage. Dans les années '70, on s'aperçut que les macrophages expriment à leur surface des récepteurs qui séquestrent les résidus mannosyle des glycoprotéines extracellulaires et internalisent ces glycoprotéines par endocytose. Cette découverte suggéra qu'on pouvait acheminer au macrophages, sélectivement, une glucocérébrosidase artificielle, pourvu qu'on mette ses résidus mannosyle à découvert. On prépara de cette façon de la glucocérébrosidase placentaire humaine ; son administration se révéla efficace pour soigner la maladie de Gaucher.

Cette thérapie substitutive est malheureusement coûteuse : rien que la

Glucocérébroside — Glucocérébrosidase → Glucose + Céramide

La déficience enzymatique de la maladie de Gaucher empêche l'hydrolyse des glucocérébrosides en glucose et céramides.

Maladie de Gaucher (suite)

dose d'enzyme requise par un patient coûte déjà 380 000 dollars par année de traitement. Comme peu de patients peuvent se payer ce traitement, leur avenir dépend de la bonne volonté des compagnies d'assurance. On espère que la production de glucocérébrosidase par ingénierie génétique fera baisser le coût du traitement et rendra la thérapie de remplacement plus abordable. En outre, la maladie de Gaucher semble un candidat favorable à la thérapie génique : il suffirait d'introduire l'ADNc de la glucocérébrosidase normale dans les cellules souches médullaires dont sont issus les macrophages.

Référence

Beutler, E. 1995. Gaucher's Disease. *Adv. Genet.* 32: 17-49.

curieuse exception est la maladie des cellules I, due à ce que la cellule est dépourvue de l'enzyme qui catalyse la première étape du marquage des enzymes lysosomiaux par le mannose-6-phosphate dans l'appareil de Golgi (voir figure 9.24) ; il en résulte une incapacité générale à acheminer les enzymes lysosomiaux aux lysosomes.

Les enzymes lysosomiaux sont tous des hydrolases acides, actives au pH acide (environ 5,0) régnant dans le lysosome, mais pas au pH (environ 7,2) régnant dans le reste du cytoplasme (figure 9.34). Le fait que ces hydrolases lysosomiales exigent un pH acide assure une double protection contre une digestion accidentelle du contenu du cytosol ; même si la membrane du lysosome se rompait, les hydrolases acides lysosomiales libérées seraient inertes au pH neutre du cytosol. Pour maintenir leur pH acide interne, les lysosomes concentrent activement les ions H^+ (protons), grâce à une pompe à protons de la membrane lysosomiale, qui transporte activement des protons du cytosol dans le lysosome ; ceci a lieu aux dépens de l'énergie de l'ATP, puisque cette pompe maintient dans le lysosome une concentration d'ions H^+ à peu près 100 fois plus élevée que celle régnant dans le cytosol.

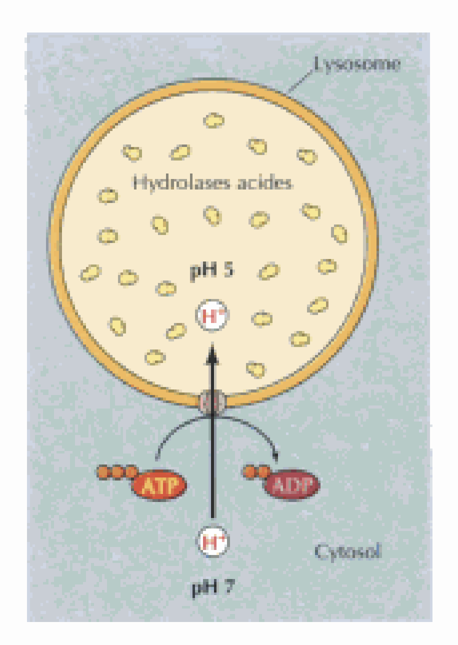
Endocytose et formation du lysosome

Un des rôles principaux du lysosome est de digérer les substances capturées dans le milieu extérieur par **endocytose**, un processus que nous exposerons au chapitre 12. Le rôle du lysosome dans la digestion du matériau incorporé par endocytose ne concerne cependant pas seulement la fonction du lysosome, mais aussi sa formation ; en effet, celui-ci se forme par fusion de vésicules de transport bourgeonnant du réseau du *trans*-Golgi à un endosome, qui contient des molécules captées par endocytose au niveau de la membrane plasmique.

La formation du lysosome représente donc une intersection entre la voie sécrétoire, qui mature les protéines lysosomiales, et la voie endocytaire, qui capture les molécules extracellulaires au niveau de la surface de la cellule (figure 9.35). Le matériau extracellulaire est capturé dans des vésicules tapissées de clathrine, qui bourgeonnent sur la membrane plasmique puis fusionnent avec des **endosomes** précoces. Les composants membranaires regagnent ensuite la membrane plasmique (exposé détaillé du processus au chapitre 12) et les endosomes précoces mûrissent pour donner des endosomes tardifs, les précurseurs des lysosomes. Une des modifications primordiales de cette maturation est l'abaissement du pH interne jusqu'à environ 5,5, événement qui jouera un rôle crucial dans le transfert des hydrolases lysosomiales triées dans le réseau du *trans*-Golgi.

On a mentionné que les hydrolases acides sont acheminées au lysosome grâce à leur résidu mannosyl-6-phosphate, reconnu par le récepteur de mannosyl-6-phosphate siégeant dans le réseau du *trans*-Golgi, et qu'elles sont empaquetées dans des vésicules enrobées de clathrine. Après démembrement du manteau de clathrine, ces vésicules fusionnent avec les endosomes tardifs et le pH interne acide pousse les hydrolases acides à se dissocier du

Figure 9.34
Structure du lysosome. Le lysosome contient une variété d'hydrolases acides qui sont actives au pH acide maintenu dans l'enceinte du lysosome, mais pas au pH neutre du cytosol. L'acidité du contenu de lysosome est due à une pompe à protons siégeant dans la membrane lysosomiale, pompe qui importe des protons du cytosol aux dépens de l'énergie d'hydrolyse de l'ATP.



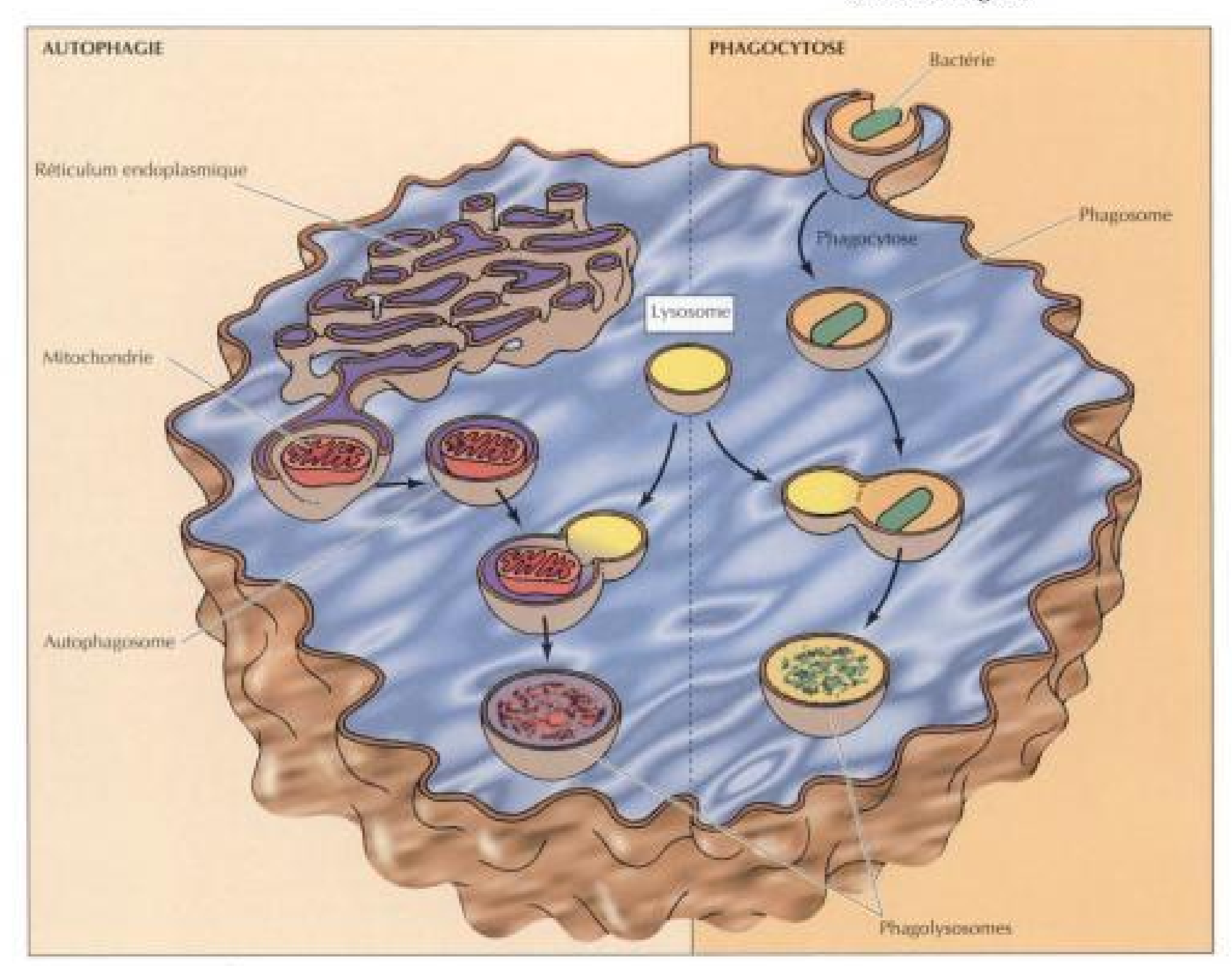
récepteur de mannosyl-6-phosphate (voir figure 9.35) ; ces hydrolases sont donc libérées dans la lumière de l'endosome, tandis que les récepteurs restent enfouis dans la membrane avant d'être renvoyés au Golgi. L'endosome tardif devient un lysosome dès qu'il a acquis son complément d'hydrolases acides, qui digéreront les molécules capturées à l'origine par endocytose.

Phagocytose et autophagie

S'ils détruisent les molécules incorporées par endocytose, les lysosomes digèrent aussi des matériaux arrivés par deux autres routes, à savoir la phagocytose et l'autophagie (figure 9.36). Dans la **phagocytose**, des cellules spécialisées, par exemple les macrophages, engloutissent et détruisent de grosses particules, notamment des bactéries, des débris cellulaires et des cellules arrivées à la fin de leur vie, dont l'organisme doit se débarrasser. Ces grands débris sont engloutis par des vacuoles de phagocytose (**phagosomes**), qui fusionnent ensuite avec un lysosome, qui digèrera leur contenu. Les lysosomes ainsi formés (**phagolysosomes**) sont parfois de très grande taille, et hétérogènes, car leur aspect est fixé par la forme et la taille de la charge qu'ils sont en train de digérer (figure 9.37).

Les lysosomes effectuent aussi l'**autophagie**, c'est-à-dire le renouvellement graduel des propres composants de la cellule. À la première étape de l'autophagie, on observe l'encerclement d'un organite (par exemple une

Figure 9.36
Lysosome dans la phagocytose et l'autophagie. Dans la phagocytose, de grosses particules, comme des bactéries, sont englouties par des vacuoles phagocytiques, ou phagosomes. Dans l'autophagie, des organites intracellulaires (comme les mitochondries) sont encerclés par des régions membranaires du RE, pour donner des autophagosomes. Phagosomes et autophagosomes fusionnent alors avec un lysosome pour former de grands phagolysosomes, au sein desquels leur contenu est digéré.



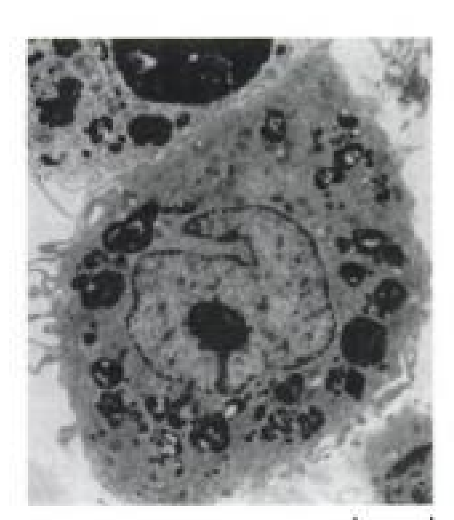


Figure 9.37
Micrographie électronique de phagolysosomes dans un macrophage.
(Fred E. Hossler/Visuals Unlimited).

mitochondrie) par une membrane issue du RE. La vésicule résultante (un **autophagosome**) fusionne alors avec un lysosome, et son contenu est digéré (voir figure 9.36). Comme on l'a mentionné au chapitre 7, l'autophagie effectue un renouvellement graduel des organites cytoplasmiques ; en outre, l'autophagie joue un rôle important dans le remodelage des tissus au cours de la différenciation.

TERMES CLÉ

réticulum endoplasmique (RE), RE rugueux, RE lisse, vésicule de sécrétion, voie sécrétoire

séquence signal, microsome, particule de reconnaissance du signal (PRS), ARN 7SL, peptidase du signal

isomérase des disulfures protéiques, ancre glycosylphosphatidylinositol (ancre GPI)

chaperon de bascule

Résumé

RÉTICULUM ENDOPLASMIQUE

Réticulum endoplasmique et sécrétion de protéines : Le réticulum endoplasmique est le premier carrefour sur la voie de la distribution des protéines. Les protéines destinées au milieu extracellulaire, aux lysosomes et à la membrane plasmique sont traduites sur des ribosomes liés à la membrane, et sont transférées dans le RE pendant leur synthèse.

Adressage de protéines au réticulum endoplasmique : Les ribosomes en train de synthétiser des protéines de sécrétion sont attirés contre le RE par une séquence signal du bout aminé de la chaîne polypeptidique. Les chaînes polypeptidiques naissantes sont alors transférées à l'intérieur du RE par des pores protéiques et libérées dans la lumière du RE par clivage de leur séquence signal.

Insertion de protéines dans la membrane du RE : Les protéines intrinsèques de la membrane plasmique, ou des membranes du RE, du Golgi et des lysosomes sont d'abord insérées dans les membranes du RE, mais elles ne passent pas dans sa lumière, elles restent ancrées par leurs hélices α transmembranaires qui arrêtent le transfert de la chaîne naissante à travers la membrane.

Reploiement et remaniement des protéines dans le RE : Les chaînes polypeptidiques se reploient en leur conformation tridimensionnelle correcte au sein du RE. Le RE est aussi le siège des glycosylations sur N et de l'ajout des ancres GPI.

RE lisse et synthèse des lipides : Le RE est le site de synthèse principal des lipides dans la cellule eucaryote ; ce RE lisse abonde dans les cellules où prédomine un métabolisme lipidique et un système de détoxication des médicaments liposolubles.

Sortie des protéines et des lipides synthétisés dans le RE : Les protéines et les lipides sont transportés du RE à l'appareil de Golgi par des vésicules. Les protéines qui restent dans le RE sont marquées par une séquence qui dicte leur retour du Golgi au RE *via* une voie de recyclage. D'autres séquences d'adressage commandent l'emballage sélectif de protéines d'exportation dans des vésicules qui les amènent au Golgi.

L'APPAREIL DE GOLGI

Structure du Golgi : L'appareil de Golgi sert à remanier et trier les protéines, ainsi qu'à synthétiser les lipides et les polysaccharides. Les protéines sont transportées du RE au réseau du *cis*-Golgi, puis, de là, passent dans la pile des membranes du Golgi, où ont lieu la majorité des activités métaboliques de l'appareil de Golgi. Les protéines remaniées sont transportées de la pile du Golgi au réseau du *trans*-Golgi, où elles sont triées et emballées dans des vésicules de transport destinées aux lysosomes, à la membrane plasmique ou au milieu extracellulaire.

appareil de Golgi, complexe de Golgi, réseau du cis-Golgi, pile du Golgi, réseau du trans-Golgi

Glycosylation des protéines au sein du Golgi : Les oligosaccharides liés à N qui ont été ajoutés aux protéines dans le RE sont modifiés dans le Golgi. Les protéines destinées au lysosome sont sélectivement phosphorylées sur certains de leurs résidus mannosyle et les résidus mannosyl-6-phosphate formés servent de signal d'adressage qui dicte leur transport au lysosome à partir du réseau du *trans*-Golgi. La glycosylation sur O a lieu aussi dans le Golgi.

mannose 6-phosphate, sceau de signalisation

Métabolisme des lipides et des polysaccharides dans le Golgi : L'appareil de Golgi est le siège de la synthèse des glycolipides, des sphingomyélines et des polysaccharides complexes des parois végétales.

Tri et exportation de protéines dans l'appareil de Golgi : Les protéines sont triées dans le réseau du *trans*-Golgi *via* leur emballage dans des vésicules de transport destinées au milieu extracellulaire, à la membrane plasmique, aux lysosomes ou aux vacuoles des levures et des plantes. Dans certaines cellules épithéliales polarisées, les protéines sont véhiculées sélectivement soit au domaine apical, soit au domaine basolatéral de la membrane plasmique.

domaine apical, domaine basolatéral, vacuole

MÉCANISME DU TRANSPORT VÉSICULAIRE

Approche expérimentale suivie pour élucider le transport par vésicules interposées : On a élucidé le mécanisme du transport par vésicules grâce à des mutants de levure, à des systèmes acellulaires reconstitués et à des préparations de membranes synaptiques.

vésicule synaptique

Protéines d'enrobage et bourgeonnement de vésicules : La face cytoplasmique des vésicules se couvre de protéines qui entraînent le bourgeonnement vésiculaire et choisissent les molécules à transporter.

vésicule tapissée de clathrine, vésicule tapissée de COP, clathrine, adaptine, ARF

Fusion de vésicules : Il semble que l'accostage d'une vésicule à la membrane cible adéquate soit dicté par des interactions entre membres d'une paire de protéines transmembranaires. La fusion entre une vésicule et la membrane cible est due alors à des protéines de fusion générales qui sont séquestrées par le complexe.

hypothèse des SNARE, Rab

LYSOSOME

Hydrolases lysosomiales acides : le lysosome contient une série d'hydrolases acides qui détruisent protéines, acides nucléiques, polysaccharides et lipides. Ces enzymes ne fonctionnent qu'au pH acide existant au sein du lysosome.

lysosome, maladie de surcharge lysosomiale

Endocytose et genèse du lysosome : les molécules captées à l'extérieur par endocytose sont transportées dans les endosomes, qui se transforment en lysosomes au fur et à mesure que les hydrolases acides lui sont fournies par le Golgi.

endocytose, endosome

Phagocytose et autophagie : On doit au lysosome la destruction des grosses particules englouties par phagocytose et la digestion graduelle des propres composants cellulaires par autophagie. Chez l'embryon, l'autophagie joue un rôle clé pour remodeler les tissus.

phagocytose, phagosome, phagolysosome, autophagie, autophagosome

QUESTIONNAIRE

1. Dans votre ADNc recombiné, une séquence signal a été greffée au bout aminé d'une protéine nucléaire. A votre avis, à quel endroit de la cellule la protéine codée par vote ADNc ira-t-elle se placer ?

2. La protéine Sec61 est un composant clé du tunnel protéique creusé dans la membrane du RE. Dans les cellules dont Sec61 est muté, quel est le devenir des protéines qui vont habituellement s'insérer dans l'appareil de Golgi ?

3. Pourquoi les groupes glucidiques des glycoprotéines sont-ils toujours tournés vers l'extérieur de la cellule ?

4. En quoi l'addition d'un signal d'adressage au lysosome modifie-t-elle la localisation subcellulaire d'une protéine résidant normalement dans le cytosol ? Et quelle sera son influence sur la localisation d'une protéine de sécrétion ?

5. Quel sera le sort des hydrolases lysosomiales acides dans la maladie des cellules I, maladie dans laquelle la cellule est privée de l'enzyme catalysant la formation de résidus mannosyl-6-phosphate ?

POUR EN SAVOIR PLUS

Références générales

de Duve, Ch. 1987. Une visite guidée de la cellule. De Boeck-Wesmael, Bruxelles.

Rothman, J. E. et Orci.1989. Vésicules et trafic intracellulaire. *Pour la Science* n°223 :48-54.

Réticulum endoplasmique

Abeijon, C. and C. B. Hirschberg. 1992. Topography of glycosylation reactions in the endoplasmic reticulum. *Trends. Biochem. Sci.* 17: 32–36. [R]

Balch, W. E., J. M. McCaffery, H. Plutner and M. G. Farquhar. 1994. Vesicular stomatitis virus glycoprotein is sorted and concentrated during export from the endoplasmic reticulum. *Cell* 76: 841–852. [P]

Bishop, W. R. and R. M. Bell. 1988. Assembly of phospholipids into cellular membranes: Biosynthesis, transmembrane movement, and intracellular translocation. *Ann. Rev. Cell Biol.* 4: 580–610. [R]

Blobel, G. and B. Dobberstein. 1975. Transfer of proteins across the membrane. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *J. Cell Biol.* 67: 835–851. [P]

Crowley, K. S., S. Liao, V. E. Worrell, G. D. Reinhart and A. E. Johnson. 1994. Secretory proteins move through the endoplasmic reticulum membrane via an aqueous, gated pore. *Cell* 78: 461–471. [P]

Englund, P. T. 1993. The structure and biosynthesis of glycosyl phosphatidylinositol anchors. *Ann. Rev. Biochem.* 62: 121–138. [R]

Fiedler, K. and K. Simons. 1995. The role of *N*-glycans in the secretory pathway. *Cell* 81: 309–312. [R]

Gilmore, R. 1993. Protein translocation across the endoplasmic reticulum: A tunnel with toll booths at entry and exit. *Cell* 75: 589–592. [R]

Görlich, D. and T. A. Rapoport. 1993. Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane. *Cell* 75: 615–630. [P]

Hendrick, J. P. and F.-U. Hartl. 1993. Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 62: 349–384. [R]

Hurtley, S. M. and A. Helenius. 1989. Protein oligomerization in the endoplasmic reticulum. *Ann. Rev. Cell Biol.* 5: 277–307. [R]

Kent, C. 1995. Eukaryotic phospholipid biosynthesis. *Ann. Rev. Biochem.* 64: 315–343. [R]

Menon, A. K. 1995. Flippases. *Trends Cell Biol.* 5: 355–360. [R]

Paetzel, M. *et al.* 1998. Crystal structure of a bacterial signal peptidase in complex with a β-lactam inhibitor. *Nature* **396** :186-190. Comm. p. 111.

Palade, G. 1975. Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* 189: 347–358. [R]

Pelham, H. R. B. 1989. Control of protein exit from the endoplasmic reticulum. *Ann. Rev. Cell Biol.* 5: 1–23. [R]

Rapoport, T. A. 1992. Transport of proteins across the endoplasmic reticulum membrane. *Science* 258: 931–936. [R]

Sanders, S. L. and R. Schekman. 1992. Polypeptide translocation across the endoplasmic reticulum membrane. *J. Biol. Chem.* 267: 13791–13794. [R]

Simon, S. M. and G. Blobel. 1991. A protein-conducting channel in the endoplasmic reticulum. *Cell* 65: 371–380. [P]

Singer, S. J. 1990. The structure and insertion of integral proteins in membranes. *Ann. Rev. Cell Biol.* 6: 247–296. [R]

Udenfriend, S. and K. Kodukula. 1995. How glycosylphosphatidylinositol anchored membrane proteins are made. *Ann. Rev. Biochem.* 64: 563–591. [R]

Walter, P. and A. E. Johnson. 1994. Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane. *Ann. Rev. Cell Biol.* 10: 87–119. [R]

Appareil de Golgi

Baranski, T. J., P. L. Faust and S. Kornfeld. 1990. Generation of a lysosomal enzyme targeting signal in the secretory protein pepsinogen. *Cell* 63: 281–291. [P]

Burgess, T. L. and R. B. Kelly. 1987. Constitutive and regulated secretion of proteins. *Ann. Rev. Cell Biol.* 3: 243–293. [R]

Chrispeels, M. J. and N. V. Raikhel. 1992. Short peptide domains target proteins to plant vacuoles. *Cell* 68: 613–616. [R]

Conibear, E. and T. H. Stevens. 1995. Vacuolar biogenesis in yeast: Sorting out the sorting proteins. *Cell* 83: 513–516. [R]

Driouich, A., L. Faye and L. A. Staehelin. 1993. The plant Golgi apparatus: A factory for complex polysaccharides and glycoproteins. *Trends Biochem. Sci.* 18: 210–214. [R]

Hirschberg, C. B. and C. B. Snider. 1987. Topography of glycosylation in the rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Ann. Rev. Biochem.* 56: 63–87. [R]

Hurtley, S. M. 1992. Golgi localization signals. *Trends Biochem. Sci.* 17: 2–3. [R]

Kornfeld, R. and S. Kornfeld. 1985. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Ann. Rev. Biochem.* 54: 631–664. [R]

Kornfeld, S. and I. Mellman. 1989. The biogenesis of lysosomes. *Ann. Rev. Cell Biol.* 5: 483–525. [R]

Machamer, C. E. 1993. Targeting and retention of Golgi membrane proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5: 606–612. [R]

Mellman, I. and K. Simons. 1992. The Golgi complex: *In vitro veritas?* *Cell* 68: 829–840. [R]

Nothwehr, S. F. and T. H. Stevens. 1994. Sorting of membrane proteins in the yeast secretory pathway. *J. Biol. Chem.* 269: 10185–10188. [R]

Pelham, H. R. B. and S. Munro. 1993. Sorting of membrane proteins in the secretory pathway. *Cell* 75: 603–605. [R]

Rodriguez-Boulan, E. and S. K. Powell. 1992. Polarity of epithelial and neuronal cells. *Ann. Rev. Cell Biol.* 8: 395–427. [R]

Rothman, J. E. 1994. Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature* 355: 409–415. [R]

van Meer, G. 1989. Lipid traffic in animal cells. *Ann. Rev. Cell Biol.* 5: 247–275. [R]

Mécanisme du transport vésiculaire

Balch, W. E., W. G. Dunphy, W. A. Braell and J. E. Rothman. 1984. Reconstitution of the transport of protein between successive compartments of the Golgi measured by the coupled incorporation of *N*-acetylglucosamine. *Cell* 39: 405–416. [P]

De Waard, M. *et al.* Canaux calciques et complexe SNARE en interaction pour l'exocytose des neuromédiateurs. *Méd/Sci.* **14** :764-770.[R]

Ferro-Novick, S. and R. Jahn. 1994. Vesicle fusion from yeast to man. *Nature* 370: 191–193 [R]

Fischer von Mallard, G., B. Stahl, C. Li, T. C. Südhof and R. Jahn. 1994. Rab proteins in regulated exocytosis. *Trends Biochem. Sci.* 19: 164–168. [R]

Gould et Tixier-Vidal. 1995. Voyage intracellulaire des protéines. *La Recherche* n°274 :254.

Mallabiabarrena, A. and V. Malhotra. 1995. Vesicle biogenesis: The coat connection. *Cell* 83: 667–669. [R]

Mellman, I. 1995. Enigma variations: Protein mediators of membrane fusion. *Cell* 82: 869–872. [R]

Neupert, W. 1997. Protein import into mitochondria. *Adv. Prot. Chem.* **66** :863-917.

Novick, P. and P. Brennwald. 1993. Friends and family: The role of the Rab GTPases in vesicular traffic. *Cell* 75: 597–601. [R]

Novick, P., C. Field and R. Schekman. 1980. Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway. *Cell* 21: 205–215. [P]

Nuoffer, C. and W. E. Balch. 1994. GTPases: Multifunctional molecular switches regulating vesicular traffic. *Ann. Rev. Biochem.* 63: 949–990. [R]

O'Connor, V., G. J. Augustine and H. Betz. 1994. Synaptic vesicle exocytosis: Molecules and models. *Cell* 76: 785–787. [R]

Paetzel, M. *et al.* 1998. Crystal strucure of a bacterial signal peptidase in complex with a β-lactam inhibitor. *Nature* **396** :186-190.[O]

Pearse, B. M. F. and M. S. Robinson. 1990. Clathrin, adaptors, and sorting. *Ann. Rev. Cell Biol.* 6: 151–171. [R]

Pelham, H. R. B. 1994. About turn for the COPs? *Cell* 79: 1125–1127. [R]

Pryer, N. K., L. J. Wuestehube and R. Schekman. 1992. Vesicle-mediated protein sorting. *Ann. Rev. Biochem.* 61: 471–516. [R]

Rothman, J. E. 1994. Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature* 372: 55–62. [R]

Rothman, J. E. and F. T. Wieland. 1996. Protein sorting by transport vesicles. *Science* 272: 227–234. [R]

Schekman, R. and L. Orci. 1996. Coat proteins and vesicle budding. *Science* 271: 1526–1533. [R]

Schmid, S. L. 1997. Clathrin-coated vesicule formation and protein sorting : an integrated process. *Ann. Rev. Biochem.* **66** :511-548.[R]

Söllner, T., S. W. Whiteheart, M. Brunner, H. Erdjument-Bromage, S. Geromanos, P. Tempst and J. E. Rothman. 1993. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 362: 318–324. [P]

Sutton, R. B. *et al.* 1998. Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 angström resolution. *Nature* **395** :347-353.[O] + commentaire p. 328.

Whiteheart, S. W. and E. W. Kubalek. 1995. SNAPs and NSF: General members of the fusion apparatus. *Trends Cell Biol.* 5: 64–68. [R]

Lysosomes

Dunn, W. A., Jr. 1994. Autophagy and related mechanisms of lysosome-mediated protein degradation. *Trends Cell Biol.* 4: 139–143. [R]

Fukuda, M. 1991. Lysosomal membrane glycoproteins. *J. Biol. Chem.* 266: 21327–21330. [R]

Gruenberg, J. and K. E. Howell. 1989. Membrane traffic in endocytosis: Insights from cell-free assays. *Ann. Rev. Cell Biol.* 5: 453–481. [R]

Kornfeld, S. 1992. Structure and function of the mannose-6-phosphate/insulinlike growth factor II receptors. *Ann. Rev. Biochem.* 61: 307–330. [R]

Kornfeld, S. and I. Mellman. 1989. The biogenesis of lysosomes. *Ann. Rev. Cell Biol.* 5: 483–525. [R]

Neufeld, E. F. 1991. Lysosomal storage diseases. *Ann. Rev. Biochem.* 60: 257–280. [R]

Poenaru, L. 1996. Thérapie génique des maladies lysosomales. *Médecine/Sciences* **12** :35.

10

Bioénergétique et métabolisme

Mitochondries, chloroplastes, et peroxisomes

Outre leur office dans le tri et le transport des protéines, les organites du cytoplasme servent de compartiments spécialisés au sein desquels a lieu toute une série d'activités métaboliques. Les cellules doivent en premier lieu obtenir de l'énergie à partir des métabolites. Deux organites sont particulièrement destinés à produire cette énergie métabolique et à fabriquer de l'ATP : les mitochondries génèrent la plus grande part de l'énergie utilisable à partir de la dégradation catabolique des lipides et des glucides, les chloroplastes captent l'énergie solaire pour synthétiser l'ATP et les groupes réducteurs indispensables à la synthèse des glucides à partir de CO_2 et de H_2O. Le troisième organite dont nous parlerons dans ce chapitre, le peroxysome, contient les enzymes en jeu dans une série de voies métaboliques, notamment la dégradation des acides gras et le métabolisme d'un sous-produit de la photosynthèse.

Mitochondries, chloroplastes et peroxysomes diffèrent des organites décrits au chapitre précédent non seulement par leur fonction, mais aussi par le mécanisme qui effectue leur assemblage. Au lieu d'être synthétisées sur des ribosomes ancrés aux membranes et envoyées dans la lumière du réticulum endoplasmique, les protéines destinées aux peroxysomes, mitochondries et chloroplastes se forment sur des ribosomes libres du cytosol et sont ensuite importées dans l'organite approprié sous forme de chaîne polypeptidique achevée. Mitochondries et chloroplastes contiennent aussi leur propre génome dont quelques gènes sont transcrits et traduits au sein de l'organite même. Le mode de tri et d'acheminement des protéines aux organites cytoplasmiques que nous allons décrire diffère donc de la voie de transport par vésicules interposées qui cheminent du réticulum endoplasmique à l'appareil de Golgi, aux lysosomes et à la membrane plasmique.

MITOCHONDRIES

La **mitochondrie** joue un rôle clé dans la livraison d'énergie métabolique à la cellule eucaryote. Comme on l'a rappelé au chapitre 2, elle produit la plus grande partie de l'énergie libre tirée de la dégradation des glucides et des acides gras, énergie qu'elle transforme en ATP par le processus d'oxydation phosphorylante. La plupart des protéines mitochondriales sont traduites par les ribosomes libres du cytosol puis importées dans l'organite par des

signaux de ciblage particuliers. En outre, parmi les organites cytoplasmiques déjà décrits, la mitochondrie se distingue par le fait qu'elle possède son propre ADN, qui code des ARNt, des ARNr et quelques protéines mitochondriales. L'assemblage d'une mitochondrie utilise donc des protéines codées dans son propre génome et traduites en son sein ainsi que des protéines codées dans le génome nucléaire et importées du cytosol.

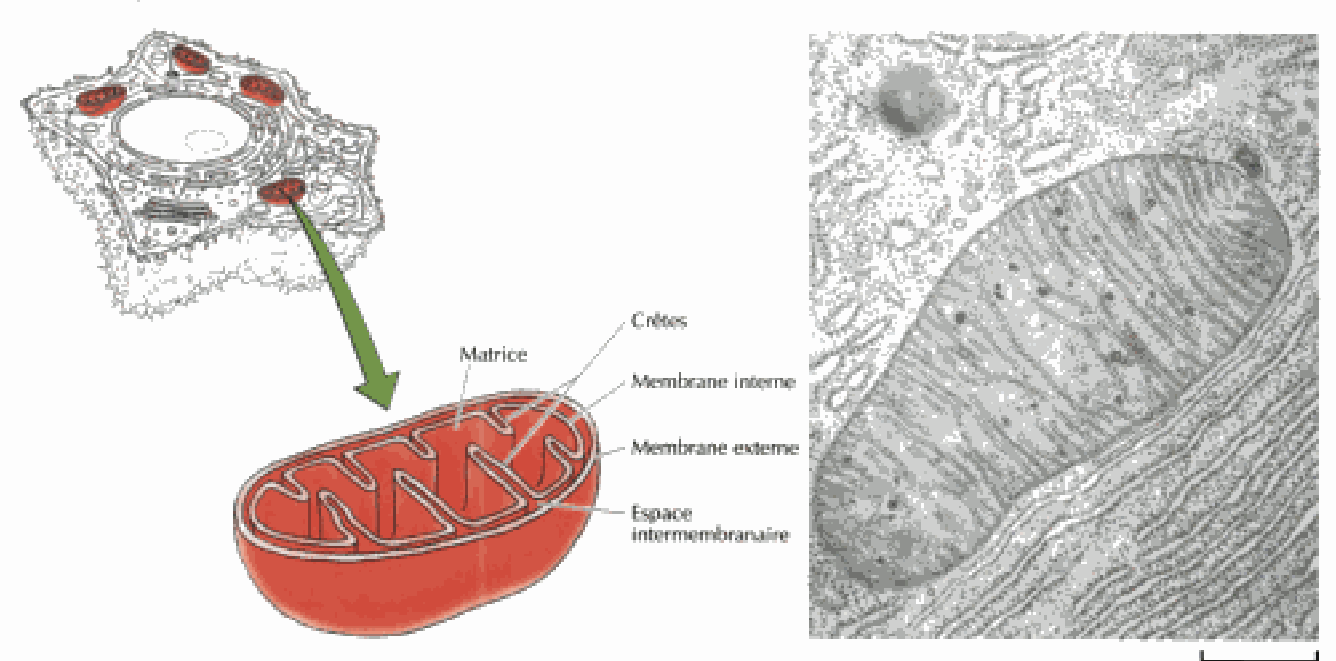
Structure et fonctionnement de la mitochondrie

La mitochondrie comporte à sa surface un dispositif bi-membranaire formé d'une membrane interne et d'une membrane externe, séparées par un espace intermembranaire (figure 10.1). La membrane interne est plissée en un grand nombre de **crêtes** qui font saillie dans l'intérieur (la **matrice**) de l'organite. Chacun de ces éléments joue un rôle particulier, mais c'est la matrice et la membrane interne qui sont les compartiments vraiment actifs de la mitochondrie.

La matrice contient le système génétique de l'organite ainsi que les enzymes effectuant les réactions clés du métabolisme oxydatif (figure 10.2). Comme nous l'avons expliqué au chapitre 2, la dégradation oxydative du glucose et des acides gras est la principale source d'énergie métabolique dans la cellule animale. Les premières étapes du métabolisme glucidique (glycolyse) se passent dans le cytosol, où le glucose est transformé en pyruvate (voir figure 2.32) ; le pyruvate est ensuite transporté dans la mitochondrie, où son oxydation complète en CO_2 livre la majeure partie de l'énergie libre (ATP) récupérée du catabolisme glucidique. Cette voie met d'abord en jeu l'oxydation du pyruvate en acétyl coenzyme A, que le cycle du citrate dégradera en CO_2 (voir figures 2.33 et 2.34). L'oxydation des acides gras produit aussi de l'acétyl CoA (voir figure 2.36), dégradé aussi dans la mitochondrie par le cycle du citrate. Les enzymes du cycle du citrate (confinés à la matrice mitochondriale) sont donc les acteurs clés de l'oxydation catabolique des glucides aussi bien que des acides gras.

L'oxydation de l'acétyl CoA en CO_2 est couplée à la réduction respective de NAD^+ et de FAD en NADH et $FADH_2$. La majorité de l'énergie dérivée du métabolisme oxydatif est à cette occasion produite dans le processus d'oxydation phosphorylante (exposée dans la section suivante), qui s'effectue au sein de la membrane mitochondriale interne. Les électrons d'énergie

Figure 10.1
Structure d'une mitochondrie. La mitochondrie comporte à sa périphérie un système bi-membranaire fait d'une membrane externe et d'une membrane interne. La membrane interne est plissée en un grand nombre de crêtes qui font saillie dans la matrice (Cliché dû à l'amabilité de K.R. Porter / Photo Researchers, Inc).



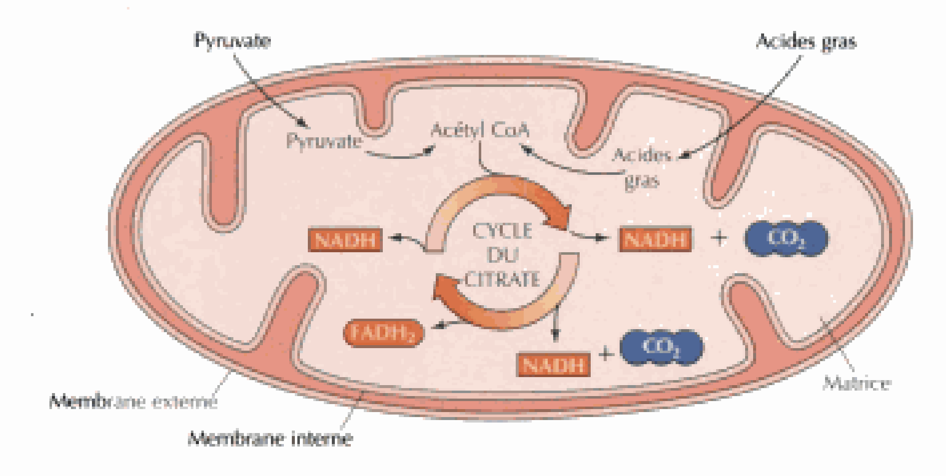


Figure 10.2
Métabolisme propre à la matrice mitochondriale. Le pyruvate et les acides gras sont importés du cytosol dans la matrice mitochondriale et transformés en acétyl CoA. L'acétyl CoA est alors oxydé en CO_2 *via* le cycle du citrate, carrefour des réactions effectuant le métabolisme oxydatif.

élevée portés par NADH et $FADH_2$ sont entraînés sur une suite de transporteurs membranaires pour échouer sur l'oxygène moléculaire. L'énergie tirée de ces réactions de transfert d'électrons est convertie en énergie potentielle, mise en réserve sous forme d'un gradient transmembranaire de protons, qui sert ensuite à synthétiser de l'ATP. C'est donc la membrane mitochondriale interne qui est le site principal de la formation d'ATP ; on le comprend immédiatement en étudiant la structure de cette membrane. Ses nombreuses crêtes accroissent beaucoup sa superficie et elle contient une proportion très élevée de protéines (70 %), impliquées aussi bien dans l'oxydation phosphorylante que dans le transport de métabolites (par exemple, le pyruvate et les acides gras) entre cytosol et mitochondrie. La membrane mitochondriale interne est par contre imperméable à la plupart des ions et des petites molécules — une propriété indispensable au maintien du gradient de protons qui conditionne l'oxydation phosphorylante.

Contrairement à la membrane interne, la membrane mitochondriale externe n'oppose aucune barrière aux petites molécules, car elle contient des protéines, les **porines**, qui forment des tunnels ouverts à la libre diffusion des molécules de masse inférieure à 6 000 daltons. L'espace intermembranaire se compose donc des mêmes ions et molécules que le cytosol ; aussi la membrane mitochondriale interne est-elle la barrière fonctionnelle qui sépare les petites molécules du cytosol de celles de la matrice et qui maintient le gradient de protons qui entraîne la phosphorylation oxydative.

Le système génétique mitochondrial

La mitochondrie contient son propre système génétique, qui est séparé et différent du génome nucléaire de la cellule. Comme on l'a vu au chapitre 1, la mitochondrie aurait évolué à partir d'une bactérie qui entretint des relations symbiotiques en colonisant l'intérieur d'un hôte de grande taille (**endosymbionte**). Le système génétique des mitochondries contemporaines descend donc du génome des bactéries endosymbiotiques originelles qui se sont muées en organites eucaryotiques.

Le génome est d'habitude formé d'une molécule d'ADN refermée sur elle-même, comme celle des bactéries, mais présente ici dans l'organite à un grand nombre d'exemplaires ; la taille de cette molécule varie beaucoup d'espèce à espèce. Le génome mitochondrial de l'Homme et de la plupart des autres animaux ne dépasse pas 16 kb, mais on rencontre des génomes mitochondriaux bien plus vastes chez les levures (voisins de 80 kb) et les plantes (de 200 à 2 000 kb). Cependant, ces grands génomes mitochondriaux se composent principalement de séquences non codantes et ne contien-

driales en jeu dans la phosphorylation oxydative ainsi que tous les enzymes du métabolisme mitochondrial (par exemple, ceux du cycle du citrate). Les protéines codées par ces gènes naissent sur des ribosomes libres dans le cytosol et sont importées dans la mitochondrie sous forme de chaîne polypeptidique achevée, mais, comme la mitochondrie a une structure bi-membranaire, l'introduction de protéines y est nettement plus compliquée que n'est le transfert d'une chaîne polypeptidique à travers une simple couche phospholipidique. Les protéines destinées à la matrice mitochondriale doivent traverser d'abord la membrane externe, puis la membrane interne ; les autres protéines importées doivent être réparties entre les divers compartiments de l'organite (par exemple, l'espace intermembranaire).

L'importation de protéines dans la matrice est l'aspect le mieux connu des processus de tri et d'acheminement des protéines mitochondriales (figure 10.4). La plupart d'entre elles sont dirigées vers la mitochondrie par une

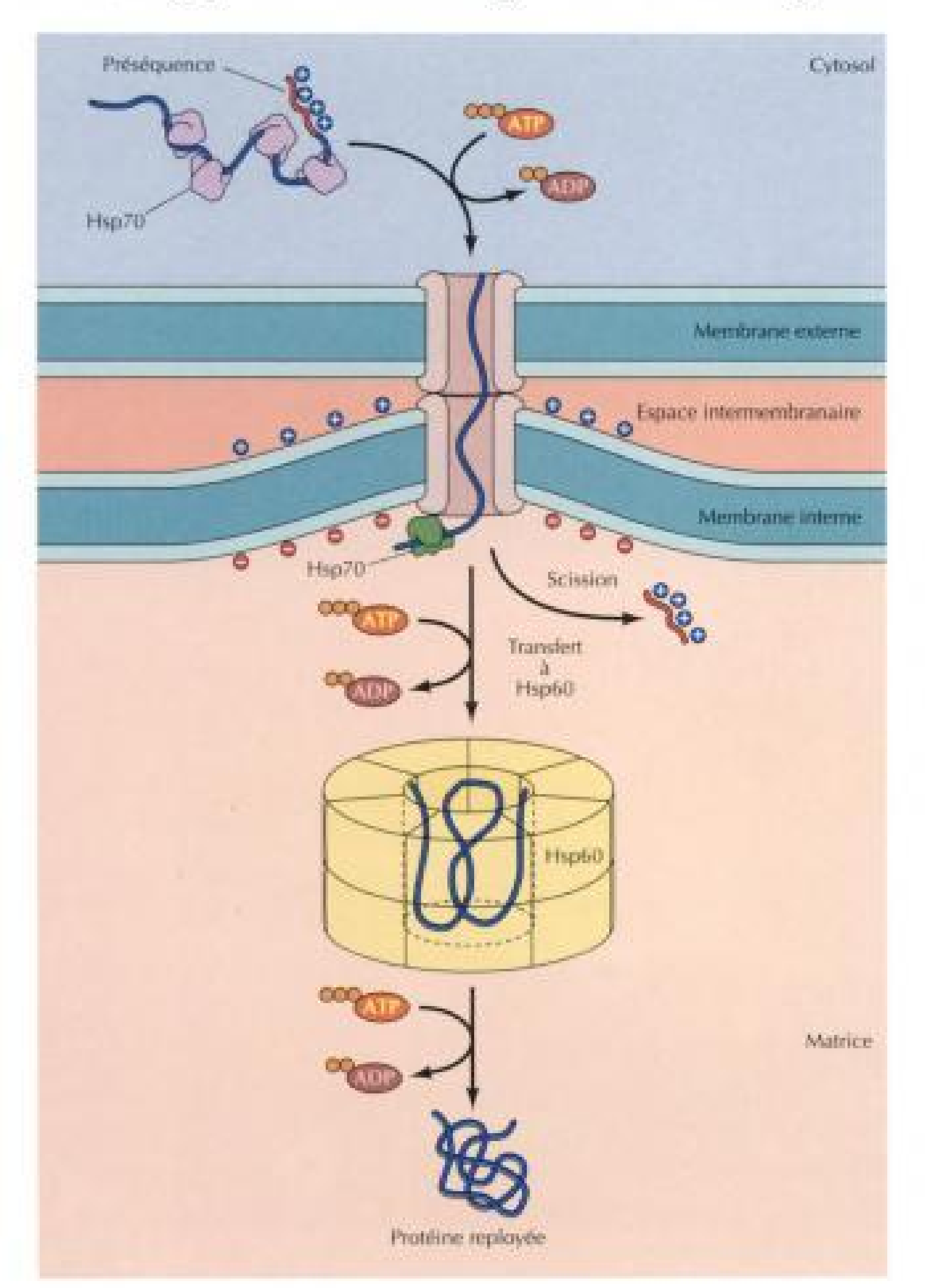
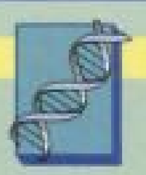


Figure 10.4
Importation de protéines dans la mitochondrie. Une préséquence amino-terminale portant des acides aminés de charge positive attire dans la mitochondrie les protéines qui la portent. Ces protéines, maintenues à l'état semi-déployé par association à la protéine cytosolique Hsp70, sont reconnues par un récepteur situé à la surface de la mitochondrie. Les protéines déployées sont ensuite transférées à travers les membranes externe et interne, aux endroits où ces membranes sont en contact étroit. Le passage à travers la membrane interne ne se fait qu'en présence d'un des composants du gradient électrochimique, à savoir le potentiel électrique transmembranaire. La préséquence est ensuite éliminée par une protéase de la matrice, puis une Hsp70 mitochondriale engloutit la chaîne polypeptidique au moment où elle franchit la membrane mitochondriale interne, pour la repousser dans la matrice. Une Hsp60 mitochondriale aide enfin au reploiement du polypeptide arrivé dans la matrice.

MÉDECINE MOLÉCULAIRE



Désordres d'origine mitochondriale : la neuropathie optique congénitale de Leber (NOCL)

Pathogénie

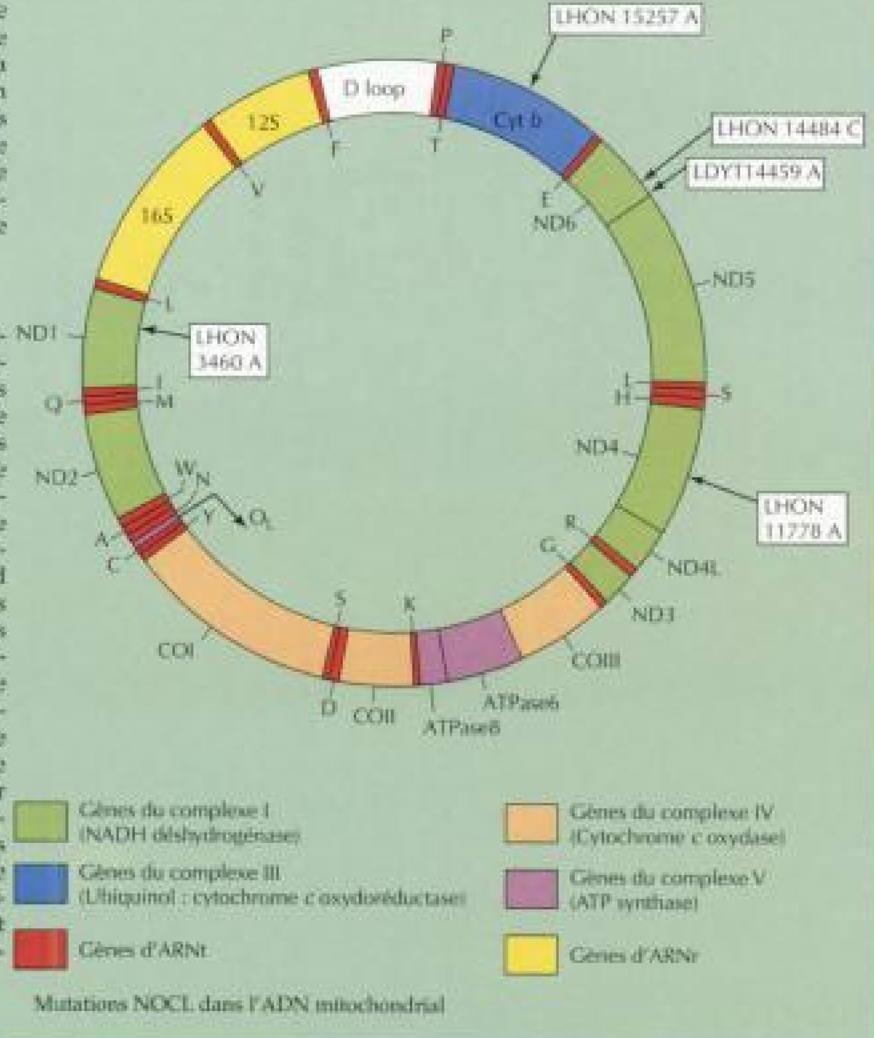
La neuropathie optique congénitale de Leber est rare ; elle mène à la cécité par dégénérescence du nerf optique. La maladie ne se manifeste que par un seul signe, une perte progressive de la vision entre l'âge de 15 et de 35 ans. Les individus qui héritent du défaut génétique responsable de la NOCL ne sont pas tous atteints et la femme est moins fréquemment atteinte que l'homme. Cette prédilection pourrait faire croire que cette affection est une maladie liée à l'X, mais ce n'est pas le cas, car l'homme ne transmet pas la maladie à ses enfants. La transmission de la maladie est au contraire toujours due à la mère ; ce trait plaide pour une transmission cytoplasmique plutôt que nucléaire de la NOCL, car le cytoplasme de l'œuf fécondé provient presque toujours uniquement de l'ovule.

Bases moléculaire et cellulaire

En 1988, Douglas Wallace et son équipe identifièrent une mutation ponctuelle dans l'ADN mitochondrial des individus atteints de NOCL ; cette mutation (située à la paire de bases 11 778, où une arginine est remplacée par une histidine) touche un des protomères du complexe I de la chaîne de transport d'électrons (NADH déshydrogénase). La mutation 11778 rend compte d'à peu près la moitié des cas de NOCL. On a aussi identifié trois autres mutations de l'ADN mitochondrial comme responsables de cette maladie : deux de ces mutations frappent d'autres protomères du complexe I, la troisième concerne le cytochrome *c*, qui fait partie du complexe III (voir figure). L'ensemble de ces quatre mutations rend compte de 80 % au moins des cas de NOCL. Une cinquième mutation (à la position 14 459), concerne un protomère du complexe I et est responsable soit de la NOCL, soit d'atteintes musculaires.

Les mutations qui sont responsables de la NOCL diminuent la capacité qu'a la mitochondrie d'effectuer l'oxydation phosphorylante et de produire l'ATP ; cette déficience se manifeste surtout dans les tissus dont l'oxydation phosphorylante est la source principale d'énergie, de sorte que les défauts d'un composant mitochondrial se manifestent cliniquement dans des organes bien particuliers, sans causer de maladie systémique. Le système nerveux central (y compris le cerveau et le nerf optique) dépendent très étroitement du métabolisme oxydatif, ce qui concorde bien avec le fait que les mutations de l'ADN mitochondrial causant la NOCL se manifestent surtout par la cécité.

Nous avons déjà fait remarquer que la possession des mutations NOCL ne provoque pas toujours la maladie ; seu-



Mutations NOCL dans l'ADN mitochondrial

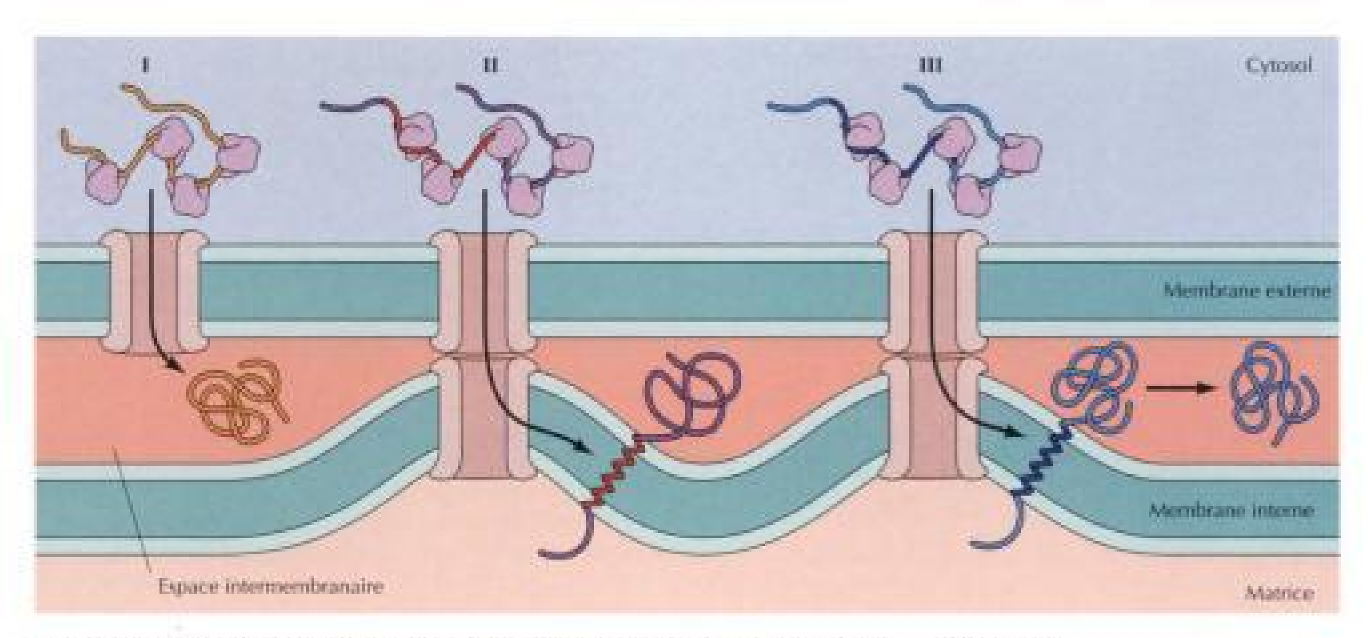


Figure 10.6
Mécanismes d'importation non conservateurs. Les protéines seront ciblées à la membrane interne et à l'espace intermembranaire par divers mécanismes non conservateurs qui évitent un passage préalable par la matrice. Citons, par exemple, la translocation directe dans l'espace intermembranaire par translocation à travers la membrane externe (I), puis une insertion directe dans la membrane interne (II). En outre, certaines protéines portent une séquence hydrophobe d'arrêt de transfert qui met fin à la translocation à travers la membrane interne puis est éliminée en libérant la protéine mature dans l'espace intermembranaire (III).

à l'hypothèse « évolutionniste » de l'origine des mitochondries, car elle rappelle le processus de sécrétion des protéines par la bactérie ; aussi l'a-t-on baptisé tri conservateur.

Néanmoins, les protéines destinées à la membrane mitochondriale interne et à l'espace intermembranaire ne suivent pas toutes la voie conservatrice que nous venons de décrire, mais utiliseraient divers mécanismes de tri non conservateurs (figure 10.6). Certaines protéines, comme le cytochrome *c*, sont transférées à l'espace intermembranaire en franchissant directement la membrane externe ; d'autres protéines passent la membrane externe et s'insèrent dans la membrane interne sans avoir été au préalable importées dans la matrice ; d'autres encore traversent la membrane externe, s'insèrent dans la membrane interne, puis sont libérées dans l'espace intermembranaire à la suite de l'élagage de leur séquence hydrophobe d'arrêt de transfert. En somme, les protéines seront acheminées à la membrane interne et à l'espace intermembranaire par plusieurs voies, parmi lesquelles les chercheurs tentent activement de connaître la prédominante.

Comme les protéines, les phospholipides des membranes mitochondriales sont aussi importés du cytosol. Chez l'animal, les phosphatidylcholine et phosphatidyléthanolamine se forment dans le réticulum endoplasmique puis sont livrées aux mitochondries par des **protéines porteuses de phospholipides**, qui pompent une à une les molécules de phospholipides accumulées dans les membranes du réticulum endoplasmique ; noyés dans le site de liaison hydrophobe de ces protéines, les phospholipides parcourent le milieu aqueux cytosolique et sont relargués quand les complexes abordent une nouvelle membrane, par exemple, celle de la mitochondrie. Celle-ci transforme alors la phosphatidyléthanolamine en phosphatidylsérine et catalyse la synthèse d'un phospholipide particulier, la cardiolipine, qui porte quatre chaînes d'acides gras (figure 10.7).

OH
$CH_2-CH-CH_2-$P$-CH_2-CH-CH_2-$P$-CH_2-CH-CH_2$
O O O O
O=C C=O O=C C=O
R_1 R_2 R_3 R_4

Figure 10.7
Structure d'une cardiolipine. Les cardiolipines sont de singuliers phospholipides « doubles », comportant quatre chaînes d'acide gras ; on les rencontre presque exclusivement dans la membrane mitochondriale interne.

La théorie chimiosmotique (suite)

matiques intermédiaires de haute énergie traqués par d'autres chercheurs.

Preuve expérimentale

Le nœud de l'hypothèse chimiosmotique était que l'« intermédiaire » sensé coupler le transport d'électrons à la synthèse d'ATP ne pouvait être autre qu'un gradient électrochimique de protons instauré à travers la membrane. Mitchell postulait qu'un tel gradient se constituait sous l'effet du transport d'électrons et que le reflux des protons à travers la membrane dans le sens énergétiquement favorisé était couplé à la synthèse d'ATP (voir figure).

Cette nouvelle vision rendait clairement compte du fait qu'on avait cherché, toujours en vain, un intermédiaire chimique de haute énergie et que la synthèse d'ATP ne se produisait jamais qu'au niveau d'une membrane intacte, mais ces arguments n'empêchaient pas le concept radical de Mitchell de heurter la doctrine biochimique de l'époque. Dans un paragraphe de la conclusion de sa publication de 1961, Mitchell commentait en philosophe sa proposition révolutionnaire :

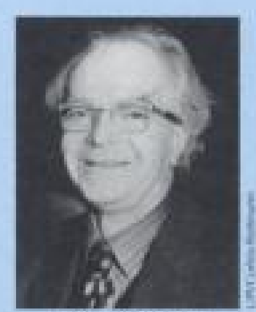
Dans les sciences exactes, cause et effet ne sont que des événements consécutifs. La plupart des biochimistes admettent à présent l'idée que le métabolisme est la cause du transport à travers une membrane. La doctrine soutenant le point de vue avancé ici est que, si les processus que nous appelons métabolisme et transport représentent des événements consécutifs, un processus métabolique peut tout aussi bien être la cause d'un transport qu'un transport la cause d'un processus métabolique.

Portée de la découverte

La proposition de Mitchell fut reçue avec scepticisme et devint le sujet d'âpres débats pendant plus d'une décennie. Néanmoins, le poids des arguments avancés par Mitchell et son équipe et par d'autres chercheurs finit par faire accepter l'hypothèse chimiosmotique par la plupart des biochimistes, pour lesquels elle devint la théorie chimiosmotique. Elle sert à présent à expliquer non seulement la synthèse d'ATP par l'oxydation phosphorylante et la photosynthèse dans les bactéries, les mitochondries et les chloroplastes, mais aussi le transport actif (consommateur d'énergie) d'une variété de molécules à travers les membranes cellulaires.

Pour cette découverte, Mitchell reçut le Prix Nobel en 1978. La conférence qu'il présenta à cette occasion débutait par cette remarque :

Bien que j'aie espéré voir un jour acceptée par tous la nature chimiosmotique du métabolisme vectoriel et du transfert d'énergie biologique, il eut été bien présomptueux de ma part de m'attendre à voir ma thèse adoptée. Max Planck ne faisait-il pas remarquer qu'une nouvelle idée scientifique ne triomphe pas du fait d'avoir convaincu ses adversaires, mais parce que ceux-ci finissent par mourir ? Le fait que ce qui est né comme l'hypothèse chimiosmotique a été acclamé comme… la théorie chimiosmotique m'a à la fois étonné et réjoui, surtout parce que ceux qui avaient été mes adversaires les plus compétents sont encore dans la fleur de leur carrière scientifique.



Peter Mitchell

qui couple le reflux transmembranaire énergétiquement favorable des protons à la synthèse d'ATP.

Couplage chimiosmotique

Le mécanisme du couplage entre flux d'électrons et synthèse d'ATP, baptisé **couplage chimiosmotique**, est un exemple frappant du lien qui existe en biologie entre une structure et une fonction. L'hypothèse du couplage chimiosmotique fut avancée en 1961 par Peter Mitchell, qui suggérait que l'ATP est produit aux dépens de l'énergie mise en réserve sous forme d'un gradient protonique établi à travers les membranes biologiques, et non par transfert chimique direct de groupes d'énergie libre élevée. Les biochimistes furent d'abord très sceptiques quant à l'hypothèse chimiosmotique et il fallut plus d'une décennie pour que la communauté scientifique l'accepte. Petit à petit des arguments irréfutables vinrent confirmer cette hypothèse ; on considère à présent le couplage chimiosmotique comme un mécanisme de synthèse d'ATP assez général puisqu'il existe non seulement dans la mitochondrie, mais aussi dans le chloroplaste et les bactéries, chez lesquelles c'est le gradient de protons à travers la membrane plasmique qui génère l'ATP.

Le transfert d'électrons au sein des complexes I, III et IV est couplé à un

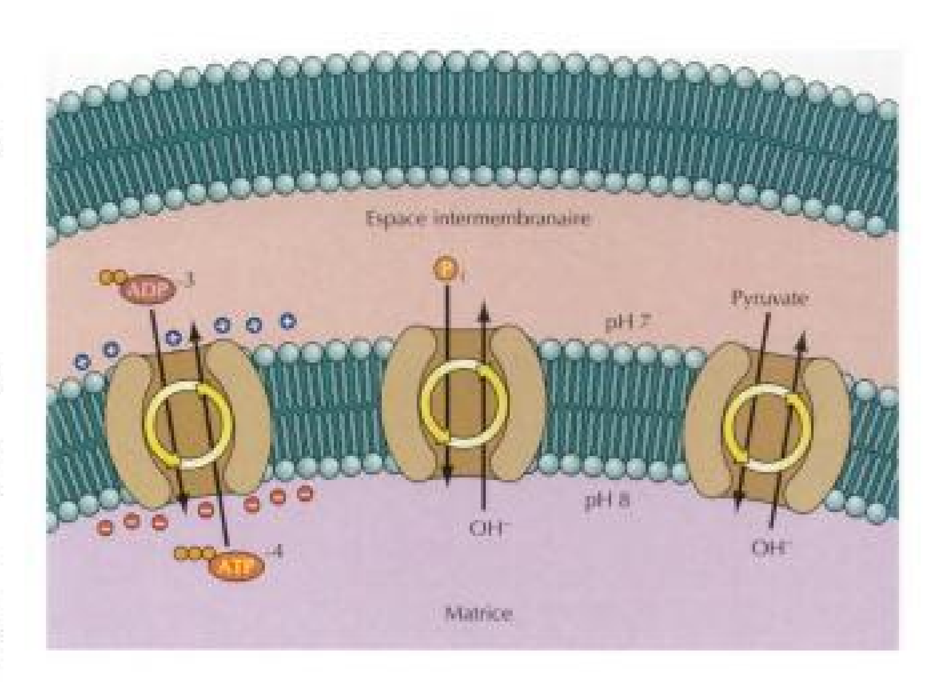


Figure 10.12
Transport de métabolites à travers la membrane mitochondriale interne. Le transport de petites molécules à travers la membrane mitochondriale interne a lieu sur des transporteurs protéiques transmembranaires et consomme le gradient électrochimique. Ainsi, l'ATP passe de la mitochondrie au cytosol sur un transporteur qui l'échange contre un ADP. C'est la composante potentiel électrique du gradient électrochimique qui entraîne cet échange : portant une charge négative (-4) plus élevée que celle de l'ADP (-3), l'ATP est extrait de la matrice mitochondriale vers le cytosol et l'ADP importé dans la mitochondrie. Par contre, le transport de phosphate (P_i) et de pyruvate est couplé à un échange d'ion hydroxyle (OH^-) ; dans ce cas, la composante pH du gradient électrochimique force l'exportation des ions hydroxyle, couplée au flux de P_i et de pyruvate vers la mitochondrie.

L'énergie tirée du gradient électrochimique sert encore à transporter d'autres métabolites dans la mitochondrie, par exemple, le pyruvate du cytosol (produit par la glycolyse), introduit par un transporteur qui échange ion pyruvate contre ion hydroxyle. D'autres intermédiaires du cycle du citrate sont capables de faire la navette entre la mitochondrie et le cytosol *via* des mécanismes d'échange similaires.

CHLOROPLASTES ET AUTRES PLASTIDES

Le **chloroplaste**, l'organite effectuant la photosynthèse, ressemble en bien des points à la mitochondrie. Tous deux sont des producteurs d'énergie métabolique, ils ont évolué par endosymbiose, ils contiennent leur propre système génétique et se multiplient par division. Néanmoins, le chloroplaste est plus grand et plus complexe que la mitochondrie et, outre sa production d'ATP, effectue plusieurs tâches cruciales, notamment celle de transformer par photosynthèse le CO_2 en glucides. Le chloroplaste fait en plus la synthèse des acides aminés, des acides gras et des composants lipidiques de ses membranes. Il peut aussi réduire le nitrite (NO_2^-) en ammoniac (NH_3), étape essentielle de l'incorporation d'azote dans les composés organiques. Le chloroplaste n'est d'ailleurs qu'un des membres d'une famille d'organites apparentés (les plastides) chargés de toutes sortes de tâches dans les cellules végétales.

Structure et fonction du chloroplaste

Les chloroplastes des plantes sont de grands organites (5 à 10 µm de long) qui, comme les mitochondries, possèdent une membrane double, l'enveloppe chloroplastique (figure 10.13). Outre les membranes externe et interne de cette enveloppe, le chloroplaste comporte un troisième système membranaire, intérieur, la **membrane du thylacoïde** ; elle forme un réseau de disques aplatis, les thylacoïdes, souvent rassemblés en piles appelées granum. Vu la présence de ces trois membranes, l'anatomie du chloroplaste est plus complexe que celle de la mitochondrie, puisque ses trois membranes partagent l'organite en trois compartiments internes distincts : (1) l'espace intermembranaire, entre les deux membranes de l'enveloppe chloroplas-

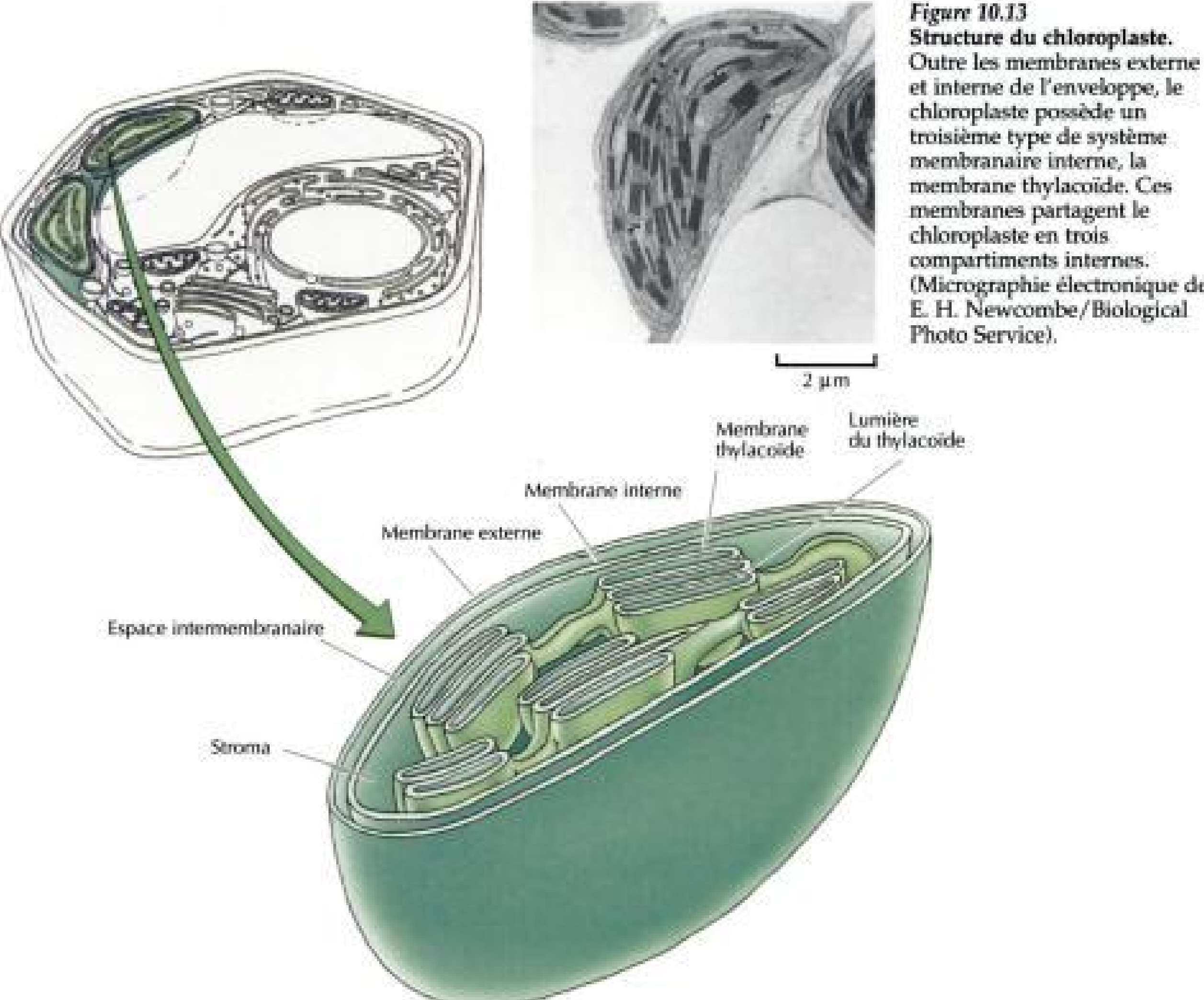


Figure 10.13
Structure du chloroplaste. Outre les membranes externe et interne de l'enveloppe, le chloroplaste possède un troisième type de système membranaire interne, la membrane thylacoïde. Ces membranes partagent le chloroplaste en trois compartiments internes. (Micrographie électronique de E. H. Newcombe/Biological Photo Service).

tique, (2) le **stroma**, à l'intérieur de l'enveloppe, mais hors des membranes thylacoïdes, et (3) la lumière du thylacoïde.

Cette plus grande complexité n'empêche pas les membranes du chloroplaste de fonctionner de manière très semblable à celles de la mitochondrie, comme on doit s'y attendre en comparant le rôle des deux organites dans la génération chimiosmotique d'ATP. Comme celle de la mitochondrie, la membrane externe de l'enveloppe chloroplastique contient des porines et est dès lors tout à fait perméable aux petites molécules. Par contre, la membrane interne de l'enveloppe est imperméable aux ions et aux métabolites, qui n'atteignent donc le chloroplaste que *via* des transporteurs membranaires particuliers. Ces propriétés des membranes interne et externe de l'enveloppe chloroplastique rappellent celles des membranes mitochondriales interne et externe : dans les deux organites, c'est la membrane interne qui s'oppose au va-et-vient des molécules entre le cytosol et l'intérieur de l'organite. Le stroma chloroplastique exerce la même fonction que la matrice mitochondriale : il contient le système génétique du chloroplaste ainsi que tout une série d'enzymes du métabolisme, y compris ceux qui effectuent la conversion clé du CO_2 en glucide au cours de la photosynthèse.

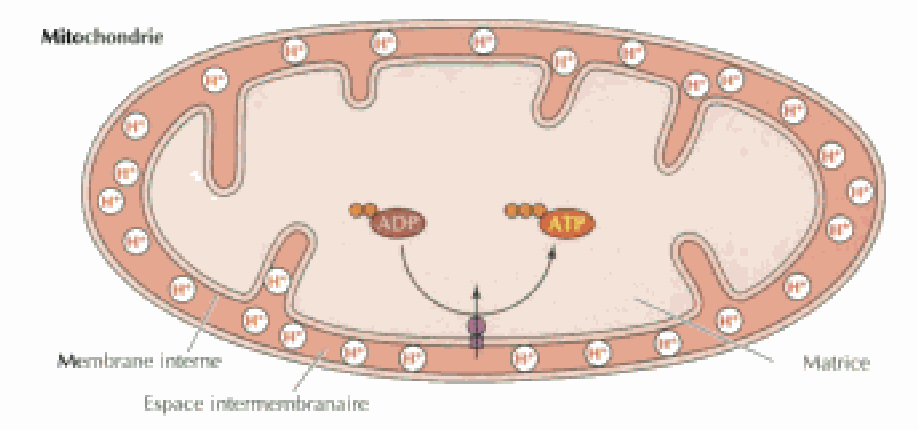
C'est la membrane thylacoïde qui marque la principale différence structurale et fonctionnelle entre le chloroplaste et la mitochondrie. Cette mem-

brane est le nœud de la fonction du chloroplaste ; elle y joue le rôle que la membrane mitochondriale interne remplit dans le transfert d'électrons et la génération chimiosmotique d'ATP (figure 10.14). La membrane interne de l'enveloppe chloroplastique (elle n'est pas plissée en crêtes) n'intervient pas dans la photosynthèse, le système de transport d'électrons du chloroplaste réside dans la membrane thylacoïde et le pompage de protons s'y effectue du stroma vers la lumière du thylacoïde ; le gradient électrochimique résultant entraîne alors la synthèse d'ATP à mesure que les protons refluent dans le stroma. Considérée comme source d'énergie métabolique, la membrane thylacoïde du chloroplaste est donc le pendant de la membrane interne de la mitochondrie.

Le génome du chloroplaste

Comme les mitochondries, les chloroplastes possèdent leur propre système génétique, témoin de leur évolution à partir de bactéries photosynthétiques. Le génome chloroplastique ressemble à celui de la mitochondrie en ceci qu'il est une molécule refermée sur elle-même, présente à de nombreux exemplaires dans l'organite, mais les génomes chloroplastiques sont plus grands et plus complexes que ceux des mitochondries, puisqu'ils atteignent de 120 à 160 kb et comportent environ 120 gènes.

Connaissant la séquence complète de plusieurs génomes chloroplastiques de plantes, on a identifié une grande partie des gènes portés par l'ADN de l'organite. Ceux-ci codent les ARNr et les protéines nécessaires à l'expression des gènes ainsi qu'une série de protéines impliquées dans la photosynthèse (tableau 10.2). Tant les ARN ribosomiaux que les ARN de transfert utilisés pour traduire les ARNm du chloroplaste sont codés dans le génome de l'organite, à savoir quatre ARNr (23S, 16S, 5S et 4,5S) et 30 sortes d'ARNt. Contrairement à ce qui se passe avec le nombre plus réduit d'ARNt codés



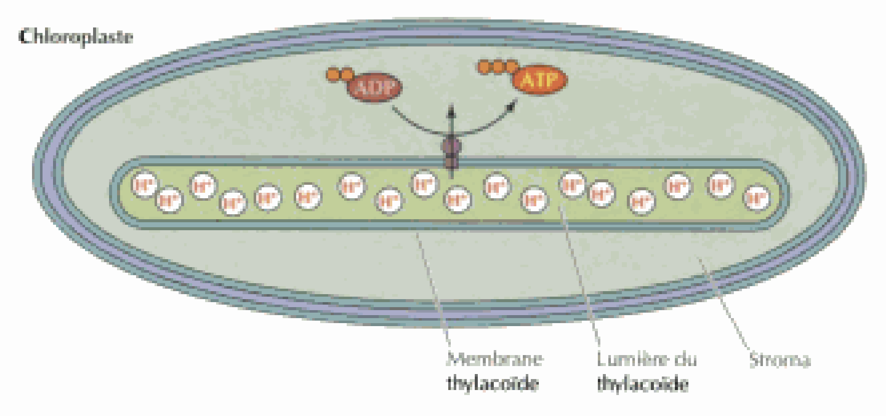


Figure 10.14
Production chimiosmotique d'ATP dans la mitochondrie et le chloroplaste. Dans la mitochondrie, le transfert d'électrons instaure à travers la membrane interne un gradient de protons qui entraîne la synthèse d'ATP dans la matrice. Dans le chloroplaste, le gradient de protons se forme à travers la membrane thylacoïde et entraîne la synthèse d'ATP dans le stroma.

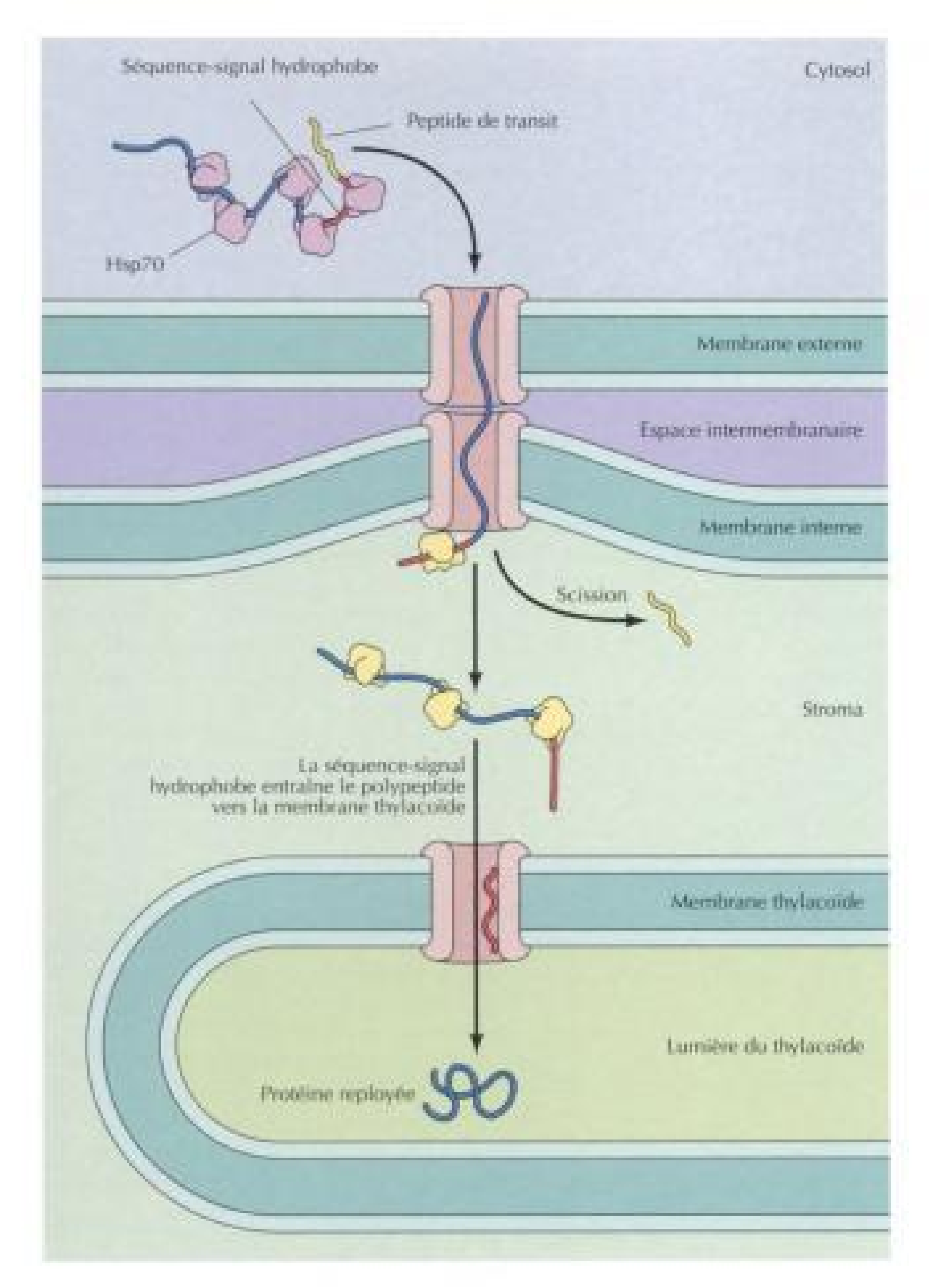


Figure 10.16
Importation de protéines dans la lumière du thylacoïde. Les protéines atteignent la lumière du thylacoïde en deux étapes. D'abord elles sont importées dans le stroma du chloroplaste, comme l'indique la figure 10.15. La scission du peptide de transit met ensuite à découvert une autre séquence-signal hydrophobe, qui entraîne alors la translocation de la protéine à travers la membrane thylacoïde.

naire de la mitochondrie (voir figure 10.5).

On connaît moins bien la façon dont les protéines atteignent les quatre autres compartiments du chloroplaste, à savoir les membranes externe et interne, la membrane thylacoïde et l'espace intermembranaire. Comme dans la mitochondrie, il semble que certaines protéines s'insèrent directement dans la membrane externe de l'enveloppe chloroplastique en y reconnaissant un récepteur superficiel ; par contre, les protéines destinées soit à la membrane thylacoïde, soit à la membrane interne de l'enveloppe du chloroplaste sont d'abord acheminées au stroma par un peptide de transit N-terminal ; une fois celui-ci éliminé, la protéine est, étiquetée par d'autres séquences encore mal connues, amenée à la membrane appropriée. On n' a pas encore identifié les séquences qui acheminent les protéines à l'espace intermembranaire, ni le chemin qu'elles suivent pour atteindre leur destination.

Autres plastides

Le chloroplaste n'est qu'un des membres, mais le plus important, d'une grande famille d'organites végétaux appelés **plastides**. Tous possèdent un génome identique à celui du chloroplaste, mais ils diffèrent de celui-ci par leur structure et leur fonction. Les chloroplastes sont spécialisés pour la photosynthèse et eux seuls comportent un système interne de membranes thylacoïdes. Les autres plastides, adaptés à d'autres aspects du métabolisme dans les cellules végétales, ne possèdent que les deux membranes de l'enveloppe et sont dépourvus de membranes thylacoïdes et des autres éléments de l'appareil photosynthétique.

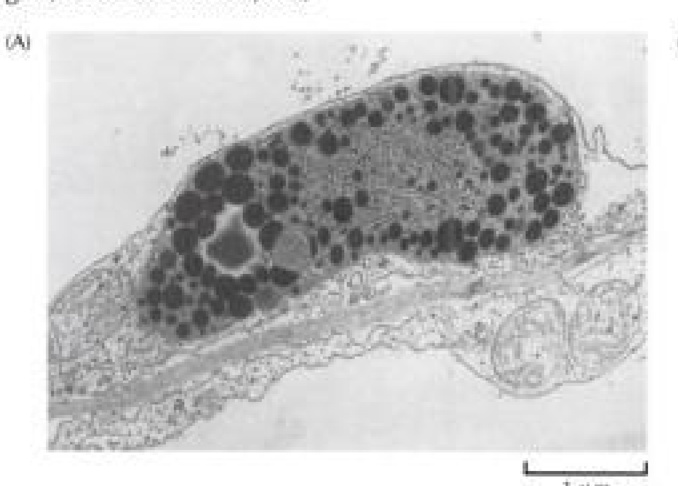
On classe habituellement les plastides selon l'espèce de pigment qu'ils contiennent, le chloroplaste, par exemple, pour sa chlorophylle. Le **chromoplaste** (figure 10.17A) est dépourvu de chlorophylle, mais contient des caroténoïdes, qui confèrent leur teinte jaune, orange et rouge aux fleurs et aux fruits, sans qu'on sache le rôle bien précis qu'ils jouent dans le métabolisme cellulaire. Le **leucoplaste** est un plaste non pigmenté qui accumule diverses molécules riches en énergie dans plusieurs tissus non photosynthétiques. L'**amyloplaste** (figure 10.17B) et l'**oléoplaste** accumulent respectivement de l'amidon et des lipides.

Tous les plastides, y compris les chloroplastes, dérivent d'un **proplastide**, petit organite (de 0,5 à 1 µm de diamètre) indifférencié présent dans les cellules des radicelles et des bourgeons, qui se divisent rapidement. Ces proplastides donnent naissance aux divers types de plastides matures selon les besoins des cellules différenciées ; en outre, une fois arrivé à maturité, un plastide peut passer d'un type à un autre, comme le chloroplaste qui devient chromoplaste quand un fruit mûrit (par exemple, la tomate). Dans ce processus, chlorophylle et membrane thylacoïde disparaissent pendant que de nombreux types de caroténoïdes sont fabriqués.

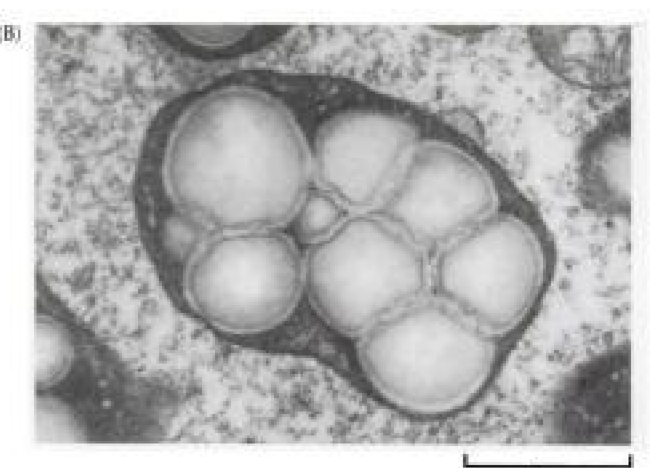
Un trait intéressant des plastides est que leur développement est commandé aussi bien par des signaux de l'environnement que par des programmes innés de différenciation cellulaire. Dans les cellules foliaires photosynthétiques, par exemple, les proplastides se muent en chloroplastes (figure 10.18) ; dans ce processus, une membrane thylacoïde naît de vésicules bourgeonnant à la surface de la membrane interne de l'enveloppe du plastide, puis les nombreux composants de l'appareil photosynthétique sont synthétisés et assemblés. Cependant, le chloroplaste ne se développe complètement qu'à la lumière ; si on fait croître une plante à l'obscurité, le développement du chloroplaste s'arrête à un stade intermédiaire (**étioplaste**) dans lequel on reconnaît un réseau semicristallin de membranes internes tubulaires encore dépourvues de chlorophylle (figure 10.19). Dès que cette plante grandie à l'obscurité est exposée à la lumière, l'étioplaste continue à

Figure 10.17
Micrographie électronique d'un chromoplaste et d'un amyloplaste. (A) Un chromoplaste contient des gouttelettes lipidiques qui accumulent les caroténoïdes. (B) Un amyloplaste est bourré de grands granules d'amidon. (A, Biophoto Associates/Photoresearchers, Inc. ; B, Dr. Jeremy Burgess/Photo Researchers, Inc.)

(A)



(B)



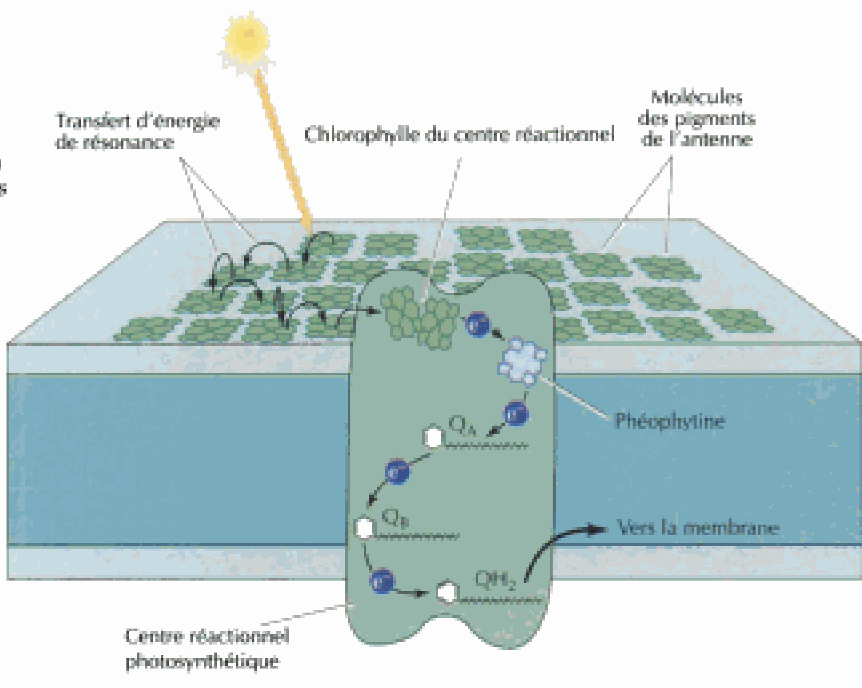


Figure 10.20
Structure d'un centre photocollecteur. Un centre consiste en des centaines de molécules de pigments antennaires, qui absorbent les photons et transfèrent leur énergie à une chlorophylle du centre réactionnel. Celle-ci cède ces électrons excités à un accepteur d'une chaîne de transporteurs d'électrons. Le centre dessiné ici est celui d'un photosystème II, où les électrons passent de la chlorophylle du centre réactionnel à la phéophytine puis aux quinones (Q_A, Q_B et QH_2).

Figure 10.21
Structure d'un centre réactionnel photosynthétique. Le centre réactionnel de *R. viridis* comprend trois protéines transmembranaires (en pourpre, bleu et beige) et un cytochrome de type *c* (en vert). Les chlorophylles et autres groupes prosthétiques sont colorés en jaune. (Aimablement transmis par Johann Diesenhofer, University of Texas Medical Center and the Nobel Foundation, 1989).



Flux des électrons à travers les photosystèmes I et II

L'énergie solaire est captée par les pigments photosynthétiques, qui, chez les plantes, sont les **chlorophylles**. L'absorption d'un photon place un électron à un état énergétique supérieur, ce qui transforme une énergie électromagnétique en une énergie chimique potentielle. Au sein de la membrane thylacoïde, les pigments sont assemblés en centres photocollecteurs, composés chacun de quelques centaines de molécules de pigments ; chacune sert d'antenne photocaptatrice et transfère l'énergie de son électron ainsi excité à une molécule de chlorophylle utilisée comme centre réactionnel. Cette chlorophylle du centre réactionnel transfère ensuite son électron de haute énergie à une molécule acceptrice d'une chaîne de transport d'électrons ; les électrons passent alors d'un transporteur membranaire au suivant, en entraînant la synthèse d'ATP et de NADPH.

Le centre réactionnel photosynthétique le mieux connu est celui de la bactérie *Rhodopseudomonas viridis*, dont la structure fut décrite par Johann Diesenhofer, Hartmut Michel, Robert Huber et leurs collègues en 1985 (figure 10.21). Ce centre comprend trois polypeptides transmembranaires, liés à un cytochrome de type *c* à la face externe de la membrane. L'énergie lumineuse est captée par une paire de molécules de chlorophylle désignée « paire spéciale » ; les électrons passent ensuite de celle-ci à une autre paire de chlorophylles, puis à d'autres groupes prosthétiques (phéophytines et quinones) ; ils arrivent ensuite à un complexe de cytochromes *bc* au niveau duquel le transfert de protons se couple à la formation d'un gradient de protons ; puis les électrons atteignent un cytochrome du centre réactionnel avant de rejoindre la paire spéciale de chlorophylles. Le centre réactionnel transforme donc l'énergie lumineuse en électrons d'énergie élevée, dont l'énergie potentielle est transformée en gradient de protons par le complexe des cytochromes *bc*.

Chez les plantes, les protéines en jeu dans les réactions lumineuses photosynthétiques sont groupées en cinq complexes dans la membrane thylacoïde (figure 10.22). Deux de ces complexes (**photosystèmes I et II**) sont des photosystèmes où les photons sont captés puis transférés aux chlorophylles

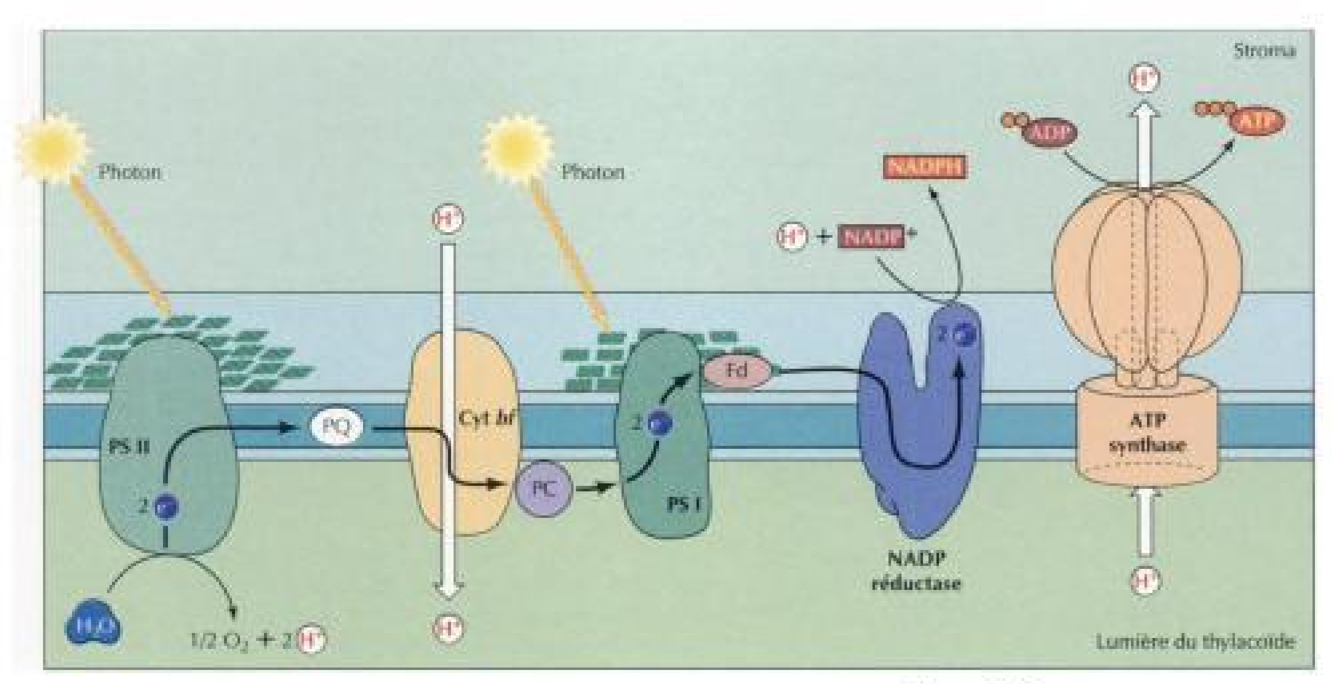


Figure 10.22
Transfert d'électrons et synthèse d'ATP dans la photosynthèse. Transfert d'électrons et synthèse d'ATP et de NADPH mettent en jeu cinq complexes protéiques de la membrane thylacoïde. Les photons sont absorbés par des complexes de molécules pigmentées associées aux photosystèmes I et II (PSI et PSII). Dans le photosystème II, l'énergie issue de l'absorption d'un photon sert à rompre la molécule d'eau au sein de la lumière du thylacoïde. Les électrons passent alors à la plastoquinone (PQ), puis au complexe des cytochromes *bf*, où une partie de leur énergie est perdue à pomper des protons dans la lumière du thylacoïde. Ces électrons passent ensuite au photosystème I *via* la plastocyanine (PC). Là, l'énergie tirée d'une nouvelle absorption de photons replace les électrons dans un état excité ; ceux-ci vont servir à réduire $NADP^+$ en NADPH dans le stroma. L'ATP synthase consommera l'énergie accumulée dans le gradient de protons pour transformer l'ADP en ATP.

d'un centre réactionnel ; les électrons excités (amenés à un niveau énergétique supérieur) passent à une série de transporteurs appartenant aux deux photosystèmes, pour atteindre un troisième complexe protéique, le **complexe des cytochromes *bf*.** Comme c'est le cas dans la mitochondrie, ces transferts d'électrons sont couplés à un transfert de protons, ici dans la lumière du thylacoïde, établissant ainsi un gradient de protons à travers la membrane thylacoïde. L'énergie accumulée dans ce gradient de protons est récupérée par un quatrième complexe protéique de la membrane thylacoïde, l'ATP synthase, qui (comme l'enzyme mitochondrial) couple le retour des protons au travers de la membrane à une synthèse d'ATP.

Le transfert d'électrons dans le chloroplaste et dans la mitochondrie diffère sur un point important, à savoir que l'énergie reçue du soleil dans la photosynthèse est non seulement convertie en ATP, mais aussi utilisée à la synthèse du NADPH nécessaire à la transformation subséquente du CO_2 en glucides. Ceci exige l'intervention de deux photosystèmes distincts dans la phase lumineuse des réactions photosynthétiques, un pour générer l'ATP, l'autre pour produire du NADPH. Les électrons passent d'un photosystème à l'autre, le photosystème I servant à produire NADPH, le photosystème II à produire l'ATP.

Le trajet des électrons part du photosystème II, l'homologue du centre réactionnel photosynthétique décrit chez *R. viridis*, mais l'énergie issue de l'absorption des photons y sert à rompre la molécule d'eau en oxygène et protons (voir figure 10.22). Cette réaction a lieu dans la lumière du thylacoïde, de sorte que le départ des protons de l'eau établit un gradient de protons à travers la membrane thylacoïde. Les électrons de haute énergie issus de ce processus passent alors sur une série de transporteurs pour atteindre la plastoquinone, un transporteur liposoluble semblable au coenzyme Q (ubiquinone) de la mitochondrie ; la plastoquinone fait passer les électrons du photosystème II au complexe des cytochromes *bf*, au sein duquel les électrons sont livrés à la plastocyanine pendant que d'autres protons sont pompés dans la lumière du thylacoïde. Le transfert d'électrons au sein du photosystème II est donc couplé à l'établissement d'un gradient de protons qui entraîne la synthèse chimiosmotique d'ATP.

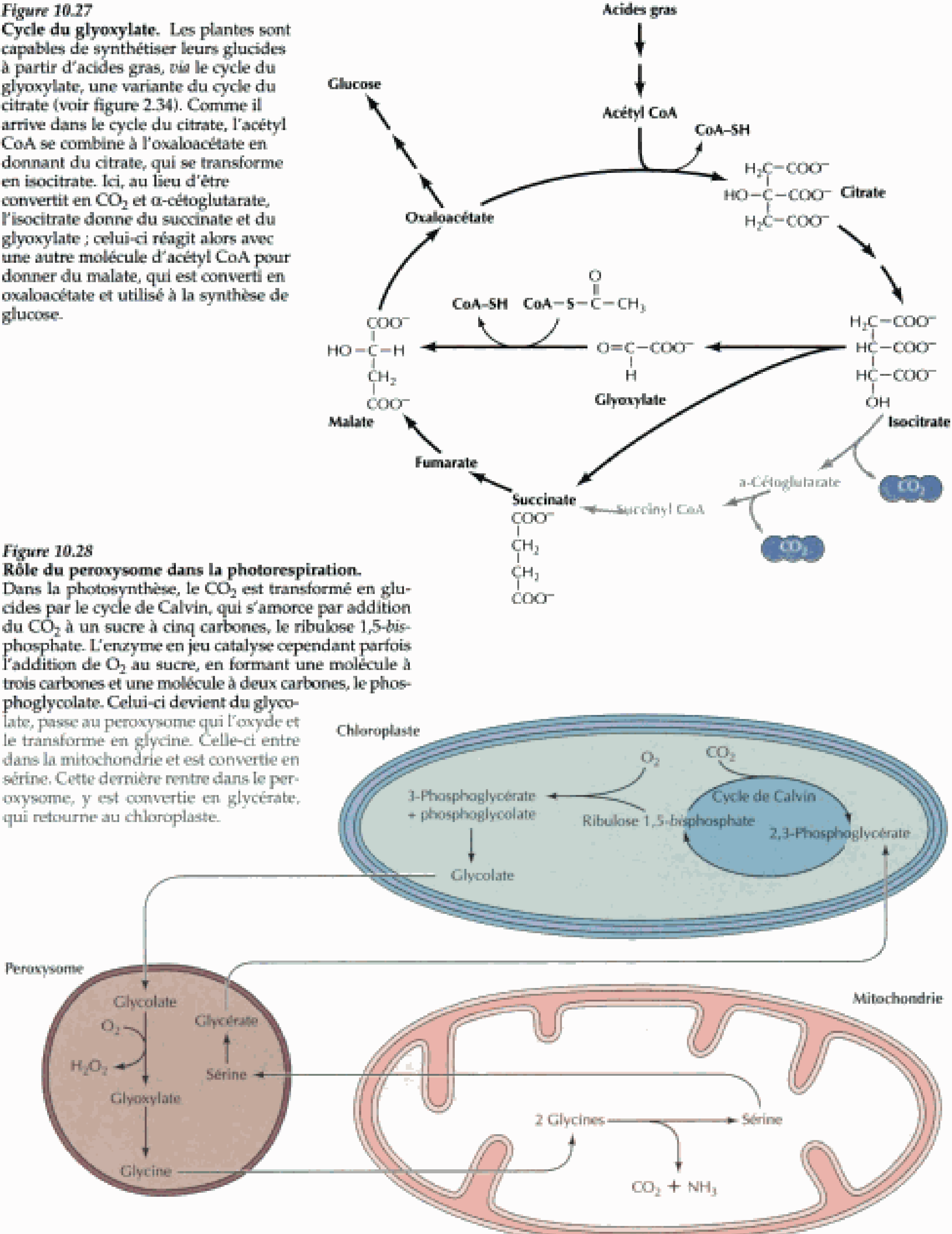


Figure 10.27
Cycle du glyoxylate. Les plantes sont capables de synthétiser leurs glucides à partir d'acides gras, *via* le cycle du glyoxylate, une variante du cycle du citrate (voir figure 2.34). Comme il arrive dans le cycle du citrate, l'acétyl CoA se combine à l'oxaloacétate en donnant du citrate, qui se transforme en isocitrate. Ici, au lieu d'être convertit en CO_2 et α-cétoglutarate, l'isocitrate donne du succinate et du glyoxylate ; celui-ci réagit alors avec une autre molécule d'acétyl CoA pour donner du malate, qui est converti en oxaloacétate et utilisé à la synthèse de glucose.

Figure 10.28
Rôle du peroxysome dans la photorespiration. Dans la photosynthèse, le CO_2 est transformé en glucides par le cycle de Calvin, qui s'amorce par addition du CO_2 à un sucre à cinq carbones, le ribulose 1,5-*bis*-phosphate. L'enzyme en jeu catalyse cependant parfois l'addition de O_2 au sucre, en formant une molécule à trois carbones et une molécule à deux carbones, le phosphoglycolate. Celui-ci devient du glycolate, passe au peroxysome qui l'oxyde et le transforme en glycine. Celle-ci entre dans la mitochondrie et est convertie en sérine. Cette dernière rentre dans le peroxysome, y est convertie en glycérate, qui retourne au chloroplaste.

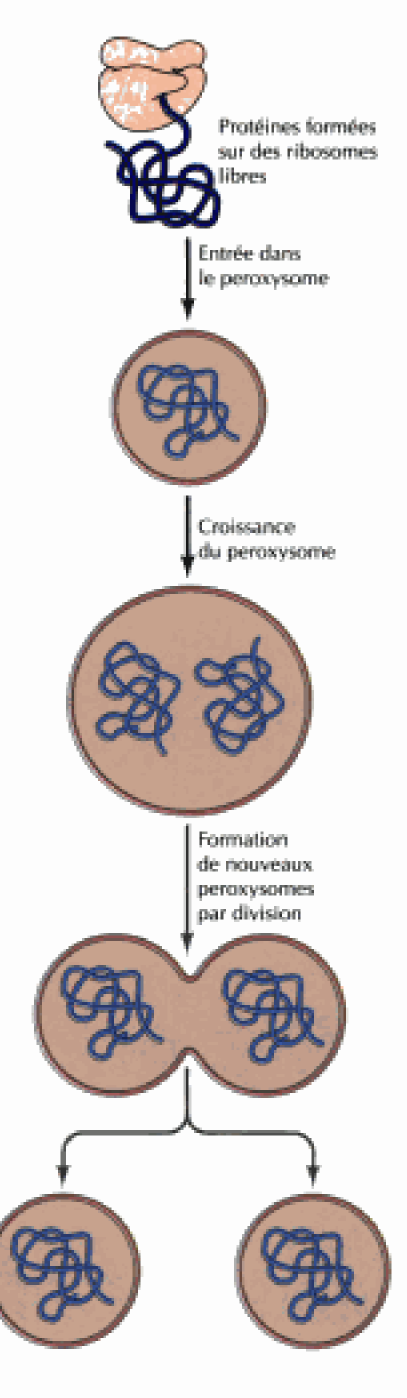


Figure 10.29
Assemblage du peroxysome. Les protéines destinées au peroxysome se forment sur des ribosomes libres et s'intègrent aux peroxysomes préexistants sous forme de chaînes polypeptidiques matures. Cette incorporation fait grandir les peroxysomes, qui se divisent en donnant de nouveaux peroxysomes.

consommé et CO_2 est produit, sans gain d'ATP. Néanmoins, comme l'utilisation occasionnelle de O_2 au lieu de CO_2 semble être une singularité inhérente à RubisCO, la photosynthèse s'accompagne généralement d'un certain degré de photorespiration. Le peroxysome remplit donc un grand rôle en récupérant et recyclant une bonne partie des carbones du glycolate.

Assemblage du peroxysome

Rappelons que l'assemblage du peroxysome ressemble essentiellement à celui de la mitochondrie et du chloroplaste, plutôt qu'à celui du réticulum endoplasmique, de l'appareil de Golgi et du lysosome. Les protéines destinées au peroxysome sont traduites sur des ribosomes libres du cytoplasme, puis transportées à l'intérieur du peroxysome sous forme de chaînes polypeptidiques complétées (figure 10.29). De leur site principal de synthèse, les phospholipides sont aussi importés par le peroxysomes, *via* des protéines de transfert de phospholipides. L'apport de protéines et de phospholipides au peroxysome fait grossir ce dernier, qui se divise pour donner de nouveaux peroxysomes.

Les protéines atteignent le peroxysome par au moins deux voies, bien conservées des levures à l'Homme. La plupart des protéines sont entraînées au peroxysome par une séquence d'acides aminés très simple, à savoir -Sér-Lys-Leu-, de leur bout carboxyle (signal 1 d'acheminement au peroxysome, ou SAP1) ; d'autres protéines y sont acheminées par une séquence de neuf acides aminés (SAP2) portée par leur bout aminé ; certaines protéines arrivent au peroxysome sous la conduite d'autres signaux encore mal connus. D'autres signaux intérieurs au polypeptide provoquent l'acheminement des protéines membranaires intrinsèques à la membrane du peroxysome. Contrairement à la translocation de chaînes polypeptidiques à travers les membranes du réticulum endoplasmique, de la mitochondrie et du chloroplaste, ces séquences-signal d'acheminement ne sont généralement pas coupées au cours de l'importation des protéines dans le peroxysome.

Les signaux SAP1 et SAP2 sont chacun reconnus par des récepteurs propres puis transférés à un complexe de translocation qui les fait passer de l'autre côté de la membrane ; on connaît cependant moins bien le mécanisme d'importation dans le peroxysome qu'on ne connaît celui qui est en jeu dans la translocation des protéines à travers la membrane du RE, ou celle de la mitochondrie et du chloroplaste. La protéine cytosolique Hsp70 semble mise en jeu dans l'importation de protéines au peroxysome, mais il n'est pas démontré que des chaperons moléculaires interviennent à l'intérieur du peroxysome ; aussi ce problème est-il l'objet d'actives investigations.

On a identifié certains composants de la machinerie d'importation des protéines au peroxysome non seulement par l'examen de mutants de levure, mais aussi de mutations associées à de graves pathologies humaines d'origine peroxysomiale. Dans certaines maladies, un seul enzyme du peroxysome est déficient, dans d'autres maladies, dues à une anomalie de la fonction peroxysomiale, plusieurs enzymes normalement importés au peroxysome restent dans le cytosol. Ce groupe de maladies est dû à une invalidation des voies SAP1 et SAP2 responsables de l'importation de protéines dans le peroxysome. Le prototype de ces pathologies est le syndrome de Zellweger, mortel dans les dix premières années de la vie ; ce syndrome est le résultat de mutations d'au moins une dizaine de gènes commandant l'importation des protéines au peroxysome ; on identifié l'un d'entre eux comme le gène codant le récepteur SAP1 qui reconnaît le signal d'acheminement au peroxysome.

Résumé

MITOCHONDRIES

Structure et fonction de la mitochondrie : La mitochondrie, nœud de la génération d'énergie métabolique, possède à sa périphérie un système à deux membranes. La matrice contient les enzymes du cycle du citrate ; la membrane interne porte les complexes protéiques nécessaires au transfert d'électrons et à la phosphorylation oxydante. Contrairement à la membrane interne, la membrane externe est tout à fait perméable aux ions et aux petites molécules.

mitochondrie, crêtes, matrice, porine

Équipement génétique de la mitochondrie : La mitochondrie porte son propre génome, qui code ses ARNr, ses ARNt et quelques-unes des protéines en jeu dans l'oxydation phosphorylante.

endosymbiose

Importation de protéines et assemblage de la mitochondrie : La plupart des protéines mitochondriales sont codées par le génome nucléaire. Elles sont traduites sur des ribosomes libres et importées dans la mitochondrie sous forme de chaîne polypeptidique achevée. Elles sont acheminées à la matrice mitochondriale sous la commande de préséquences chargées positivement. Les phospholipides passent du réticulum endoplasmique à la mitochondrie *via* des protéines de transfert de phospholipides.

préséquence, protéine de transfert de phospholipides, cardiolipine

MÉCANISME DE L'OXYDATION PHOSPHORYLANTE

Chaîne de transfert d'électrons : La majeure partie de l'énergie issue de l'oxydation des métabolites provient du transfert d'électrons des NADH et $FADH_2$ à O_2. Pour récupérer cette énergie sous une forme utilisable, les électrons doivent suivre une série de transporteurs organisés en quatre complexes protéiques portés par la membrane mitochondriale interne.

phosphorylation oxydante (= oxydation phosphorylante), chaîne de transfert (= de transport) d'électrons, coenzyme Q, ubiquinone, cytochrome c, cytochrome (c) oxydase

Couplage chimiosmotique : Les réactions exergoniques du transfert d'électrons sont couplées à la génération d'un gradient de protons à travers la membrane mitochondriale interne. L'énergie potentielle contenue dans ce gradient est recueillie par un cinquième complexe protéique, l'ATP synthase, qui couple la synthèse d'ATP au reflux énergétiquement favorisé des protons dans la matrice mitochondriale.

couplage chimiosmotique, gradient électrochimique, ATP synthase

Transport de métabolites à travers la membrane interne : Si elle entraîne la synthèse d'ATP, l'énergie potentielle du gradient de protons entraîne aussi le trafic des ATP, ADP et autres métabolites entre la mitochondrie et le cytosol.

CHLOROPLASTES ET AUTRES PLASTIDES

Structure et fonction du chloroplaste : Le chloroplaste est un grand organite effectuant la photosynthèse et plusieurs autres activités métaboliques. Comme la mitochondrie, le chloroplaste possède à sa surface une enveloppe composée de deux membranes. Il possède en plus une membrane interne, le thylacoïde, site du transfert d'électrons et de la génération chimiosmotique d'ATP.

chloroplaste, membrane thylacoïde, stroma

Génome du chloroplaste : Le génome chloroplastique comporte plus de 100 gènes, dont ceux de ses ARNr, ARNt, de certaines protéines ribosomiales et de quelques protéines en jeu dans la photosynthèse.

Tri et importation des protéines du chloroplaste : La plupart des protéines du chloroplastes sont traduites sur des ribosomes libres du cytosol et acheminées dans le chloroplaste sous la commande de

peptide de transit

peptides de transit amino-terminaux. Les protéines destinées à la membrane thylacoïde passent d'abord dans le stroma du chloroplaste, puis sont dirigées vers la membrane thylacoïde par une autre séquence-signal, hydrophobe.

plastide, chromoplaste, leucoplaste, amyloplaste, oléoplaste, proplastide, étioplaste

Autres plastides : Le chloroplaste appartient à une famille d'organites apparentés, qui tous possèdent un même génome. Les autres plastides servent à engranger les réserves énergétiques, comme l'amidon et les lipides, et interviennent dans d'autres fonctions végétales.

PHOTOSYNTHÈSE

chlorophylle, centre photocollecteur, photosystème I, photosystème II, complexe des cytochromes *bf*, NADP réductase

Flux d'électrons à travers les photosystèmes I et II : Dans la photosynthèse, l'énergie solaire est captée et convertie en des formes utilisables d'énergie chimique potentielle. L'absorption de photons par la chlorophylle excite les électrons en les portant à un niveau énergétique supérieur. Ces électrons de haute énergie sont alors transférés sur une série de transporteurs arrangés dans la membrane thylacoïde pour former deux photosystèmes et le complexe des cytochromes *bf*. Le flux ordonné d'électrons à travers les deux photosystèmes est couplé à la synthèse d'ATP au niveau du photosystème II et à la réduction de $NADP^+$ en NADPH au niveau du photosystème I. L'ATP et le NADPH servent ensuite à la synthèse de glucides à partir de CO_2, phase qui se passe dans le stroma du chloroplaste.

flux cyclique d'électrons

Flux cyclique d'électrons : Un autre trajet des électrons, le flux cyclique d'électrons, permet au photosystème I de récupérer l'énergie lumineuse sous forme d'ATP au lieu de NADPH.

Synthèse d'ATP : La synthèse chimiosmotique d'ATP est entraînée par le gradient de protons établi à travers la membrane thylacoïde.

PEROXYSOMES

peroxysome, catalase, plasmalogène, cycle du glyoxylate, glyoxysome, photorespiration

Rôle du peroxysome : Le peroxysome est un minuscule organite possédant à sa périphérie une seule membrane ; les enzymes du peroxysome prennent part à tout une série de réactions métaboliques, dont l'oxydation des acides gras, le cycle du glyoxylate et la photorespiration.

Assemblage du peroxysome : Les protéines destinées au peroxysome sont traduites sur des ribosomes libres du cytosol puis importées dans le peroxysome sous forme de chaîne polypeptidique achevée. On connaît au moins deux signaux qui acheminent les protéines à l'intérieur du peroxysome, mais on connaît encore mal le mécanisme impliqué.

QUESTIONNAIRE

1. De quelle façon le gradient électrochimique à travers la membrane mitochondriale interne contribue-t-il à l'importation des protéines ?

2. Supposez que le potentiel électrique à travers la membrane mitochondriale interne ait disparu, de sorte que le gradient électrochimique n'ait conservé qu'un gradient de concentration de protons équivalent à une unité de pH. Calculez l'énergie libre conservée dans ce gradient. Dans ces conditions, à peu près combien de protons faudrait-il pour faire la synthèse d'une molécule d'ATP ? Pour faire ce calcul, sachez que $R = 1{,}98 \times 10^{-3}$ kcal mol^{-1} deg^{-1}, $T = 298$ K (25° C) et que $\ln(x) = 2{,}3 \log_{10}(x)$.

3. Quelle est le rapport topologique entre la lumière du thylacoïde et l'espace intermembranaire du chloroplaste ?

4. Pourquoi les peptides de transit des protéines chloroplastiques ne sont-ils pas, contrairement aux préséquences des protéines mitochondriales, chargés positivement ?

5. Combien faut-il d'électrons d'énergie élevée pour que la photosynthèse produise une molécule de glucose avec départ de six molécules de O_2 ? Combien se forment de molécules d'ATP et de NADPH lors du passage de ces électrons au sein des photosystèmes I et II ?

6. Quelle fraction le peroxysome récupère-t-il des atomes de carbone convertis en glycolate par la photorespiration ?

POUR EN SAVOIR PLUS

Références générales

Horton, H. R., Moran, L. A., Ochs, R. S., Rawn, J. D. et Scrimgeour, K. G. 1994. Principes de biochimie. Traduction de la 1[re] édition américaine. De Boeck-Université. Paris-Bruxelles.

Voet, D. et Voet, J. G. 1998. Biochimie. Traduction de la 2[e] édition américaine. De Boeck-Université, Paris-Bruxelles.

Mitochondries

Attardi, G. and G. Schatz. 1988. Biogenesis of mitochondria. *Ann. Rev. Cell Biol.* 4: 289–333. [R]

Clayton, D. A. 1991. Replication and transcription of vertebrate mitochondrial DNA. *Ann. Rev. Cell Biol.* 7: 453–478. [R]

Dietrich, A., J. H. Weil and L. Marechal-Drouard. 1992. Nuclear-encoded transfer RNAs in plant mitochondria. *Ann. Rev. Cell Biol.* 8: 115–131. [R]

Glick, B. S. 1995. Can Hsp70 proteins act as force-generating motors? *Cell* 80: 11–14. [R]

Glick, B. S., E. M. Beasley and G. Schatz. 1992. Protein sorting in mitochondria. *Trends Biochem. Sci.* 17: 453–459. [R]

Gray, M. W. 1989. Origin and evolution of mitochondrial DNA. *Ann. Rev. Cell Biol.* 5: 25–50. [R]

Hartl, F.-U. and W. Neupert. 1990. Protein sorting to mitochondria: Evolutionary conservations of folding and assembly. *Science* 247: 930–938. [R]

Lill, R. and W. Neupert. 1996. Mechanisms of protein import across the mitochondrial outer membrane. *Trends Cell Biol.* 6: 56–61. [R]

Luft, R. 1994. The development of mitochondrial medicine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 8731–8738. [R]

Mihara, K. and T. Omura. 1996. Cytoplasmic chaperones in precursor targeting to mitochondria: The role of MSF and hsp70. *Trends Cell Biol.* 6: 104–108. [R]

Pfanner, N., E. A. Craig and M. Meijer. 1994. The protein import machinery of the mitochondrial inner membrane. *Trends Biochem. Sci.* 19: 368–372. [R]

Pfanner, N. and W. Neupert. 1990. The mitochondrial protein import apparatus. *Ann. Rev. Biochem.* 59: 331–353. [R]

Schatz, G. 1993. The protein import machinery of mitochondria. *Protein Sci.* 2: 141–146 [R]

Schatz, G. and B. Dobberstein. 1996. Common principles of protein translocation across membranes. *Science* 271: 1519–1526. [R]

Wallace, D. C. 1994. Mitochondrial DNA sequence variation in human evolution and disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 8739–8746. [R]

Mécanisme de l'oxydation phosphorylante

Abrahams, J. P., A. G. W. Leslie, R. Lutter and J. E. Walker. 1994. Structure at 2.8 Å resolution of F_1-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* 370: 621–628. [P]

Capaldi, R. A. 1990. Structure and function of cytochrome oxidase. *Ann. Rev. Biochem.* 59: 569–596. [R]

Hatefi, Y. 1985. The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Ann. Rev. Biochem.* 54: 1015–1069. [R]

Iwata, S., C. Ostermeier, B. Ludwig, and H. Michel. 1995. Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome *c* oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Nature* 376: 660–669. [P]

Mitchell, P. 1979. Keilin's respiratory chain concept and its chemiosmotic consequences. *Science* 206: 1148–1159. [R]

Nicholls, D. G. and S. J. Ferguson. 1992. *Bioenergetics 2*. London: Academic Press.

Pedersen, P. L. and L. M. Amzel. 1993. ATP synthases: Structure, reaction center, mechanism, and regulation of one of nature's most unique machines. *J. Biol. Chem.* 268: 9937–9940. [R]

Racker, E. 1980. From Pasteur to Mitchell: A hundred years of bioenergetics. *Fed. Proc.* 39: 210–215. [R]

Trumpower, B. L. and R. B. Gennis. 1994. Energy transduction by cytochrome complexes in mitochondrial and bacterial respiration: The enzymology of coupling electron transfer reactions to transmembrane proton translocation. *Ann. Rev. Biochem.* 63: 675–716. [R]

Chloroplastes et autres plastides

Douce, R. and J. Joyard. 1990. Biochemistry and function of the plastid envelope. *Ann. Rev. Cell Biol.* 6: 173–216. [R]

Ellis, R. J. 1990. Molecular chaperones: The plant connection. *Science* 250: 954–959. [R]

Gray, J. C. and P. E. Row. 1995. Protein translocation across chloroplast envelope membranes. *Trends Cell Biol.* 5: 243–247. [R]

Gruissem, W. 1989. Chloroplast gene expression: How plants turn their plastids on. *Cell* 56: 161–170. [R]

Keegstra, K. 1989. Transport and routing of proteins into chloroplasts. *Cell* 56: 247–253. [R]

Rochaix, J.-D. 1992. Post-transcriptional steps in the expression of chloroplast genes. *Ann. Rev. Cell Biol.* 8: 1–28. [R]

Schnell, D. J. 1995. Shedding light on the chloroplast protein import machinery. *Cell* 83: 521–524. [R]

Subramanian, A. R. 1993. Molecular genetics of chloroplast ribosomal proteins. *Trends Biochem. Sci.* 18: 177–180. [R]

Sugiura, M. 1992. The chloroplast genome. *Plant Mol. Biol.* 19: 149–168. [R]

Theg, S. M. and S. V. Scott. 1993. Protein import into chloroplasts. *Trends Cell Biol.* 3: 186–190. [R]

Photosynthèse

Arnon, D. I. 1984. The discovery of photosynthetic phosphorylation. *Trends Biochem. Sci.* 9: 258–262. [R]

Barber, J. and B. Andersson. 1994. Revealing the blueprint of photosynthesis. *Nature* 370: 31–34. [R]

Bennett, J. 1979. The protein that harvests sunlight. *Trends Biochem. Sci.* 4: 268–271. [R]

Deisenhofer, J., O. Epp, K. Miki, R. Huber, and H. Michel. 1985. Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction centre of *Rhodopseudomonas viridis*. *Nature* 318: 618–624. [P]

Deisenhofer, J. and H. Michel. 1991. Structures of bacterial photosynthetic reaction centers. *Ann. Rev. Cell Biol.* 7: 1–23. [R]

Kuhlbrandt, W., D. N. Wang and Y. Fujiyoshi. 1994. Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography. *Nature* 367: 614–621. [P]

Nicholls, D. G. and S. J. Ferguson. 1992. *Bioenergetics* 2. San Diego, CA: Academic Press.

Rögner, M., E. J. Boekema and J. Barber. 1996. How does photosystem 2 split water? The structural basis of efficient energy conversion. *Trends Biochem. Sci.* 21: 44–49. [R]

Youvan, D. C. and B. L. Marrs. 1987. Mécanismes moléculaires de la photosynthèse. *Pour la Science* 118: 50-57 [R]

Peroxisomes

McNew, J. A. and J. M. Goodman. 1996. The targeting and assembly of peroxisomal proteins: Some old rules do not apply. *Trends Biochem. Sci.* 21: 54–58. [R]

Purdue, P. E. and P. B. Lazarow. 1994. Peroxisomal biogenesis: Multiple pathways of protein import. *J. Biol. Chem.* 269: 30065– 30068. [R]

Rachubinski, R. A. and S. Subramani. 1995. How proteins penetrate peroxisomes. *Cell* 83: 525–528. [R]

Subramani, S. 1993. Protein import into peroxisomes and biogenesis of the organelle. *Ann. Rev. Cell Biol.* 9: 445–478. [R]

Tolbert, N. E. 1981. Metabolic pathways in peroxisomes and glyoxysomes. *Ann. Rev. Biochem.* 50: 133–157. [R]

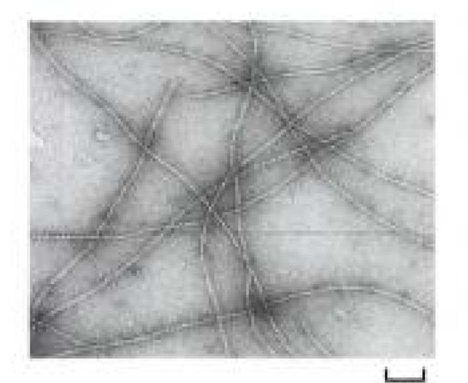
Van den Bosch, H., R. B. H. Schutgens, R. J. A. Wanders and J. M. Tager. 1992. Biochemistry of peroxisomes. *Ann. Rev. Biochem.* 61: 157–197. [R]



Cytosquelette et motilité cellulaire

[redacted]

Figure 11.1
Filaments d'actine. Filaments d'actine vus au microscope électronique. (Avec la permission de Roger Craig, University of Massachusetts Medical Center).



50 nm

tine, qui sont des composants clé du cytosquelette. Les filaments d'actine abondent sous la membrane plasmique, où ils forment un réseau qui soutient mécaniquement la membrane, détermine sa forme et sa plasticité, ce qui permet à la cellule de migrer, d'endocyter des particules et de se diviser.

Assemblage et démembrement des filaments d'actine

L'actine fut isolée en 1942, à partir de cellules musculaires, où elle constitue près de 20 % de la masse des protéines ; si on a cru d'abord qu'elle servait uniquement à la contraction musculaire, on sait maintenant qu'elle est une protéine très abondante (de 5 à 10 % de la masse des protéines) dans tous les types de cellules eucaryotes. Les levures ne possèdent qu'un seul gène d'actine, mais les eucaryotes supérieurs possèdent plusieurs types d'actine, codés chacun par un membre particulier de la famille des gènes d'actine ; les mammifères, par exemple, possèdent au moins six gènes d'actine, dont quatre s'expriment dans les divers types de muscles et deux dans les cellules non musculaires. Les actines se ressemblent cependant toutes par leur séquence d'acides aminés et témoignent de leur grande immuabilité au cours de l'évolution des eucaryotes ; ainsi, 90 % de la séquence d'acides aminés de l'actine de levure est identique à celle des actines de cellules mammaliennes.

En 1990, Kenneth Holmes, Wolfgang Kabsch et leurs collègues publiaient la structure tridimensionnelle de la molécule d'actine et celle de ses filaments. La molécule séparée (protomère) est une protéine globulaire formée de 375 acides aminés (43 kDa) ; chaque protomère (**actine globulaire, actine G**) porte de solides sites d'attache qui provoquent son attachement tête contre queue à deux autres protomères d'actine, de sorte que les protomères

(A)
Actine G
Dimère
Trimère
Bout –
Bout +
Actine F

(B)
Bout –
C
N
Bout +

(C)

Figure 11.2
Assemblage et structure d'un filament d'actine. (A) Les protomères d'actine (actine G) s'assemblent en filaments d'actine (actine F). Cela débute par la formation de dimères et de trimères, qui s'allongent par ajout de protomères à leurs deux bouts. (B) Structure d'un protomère d'actine. (C) Modèle compact de l'actine F. On a représenté, en couleur, neuf protomères d'actine. (C, avec la permission de Dan Richardson).

si la concentration de protomères libres d'actine se situe entre les concentrations critiques nécessaires, au bout plus et au bout moins, à la polymérisation des filaments d'actine ; dans ces conditions, il a y perte nette de protomères par le bout moins, compensée par un gain net de protomères au bout plus. Le processus du tapis roulant consomme de l'ATP puisque l'actine-ATP s'ajoute au bout plus du filament et que l'actine-ADP quitte le bout moins. Si on ignore le rôle exact joué par le mécanisme du tapis roulant dans la cellule, on pense qu'il témoigne d'un assemblage et d'un démembrement dynamique des filaments d'actine, indispensables au changement de forme et au déplacement de la cellule.

Remarquons que plusieurs substances employées en biologie cellulaire exercent leur action en influençant, par leur fixation, la polymérisation de l'actine. Les **cytochalasines**, par exemple, séquestrées au bout plus des filaments, empêchent ceux-ci de grandir : c'est pourquoi la cellule se déforme et est incapable d'effectuer certains types de mouvements, comme la division cellulaire qui suit la mitose ; ceci démontre que ces deux processus dépendent de la polymérisation de l'actine. Une autre substance, la **phalloïdine**, se fixe solidement aux filaments d'actine et les empêche de se dissocier en molécules d'actine ; on utilise souvent cette substance, marquée d'un groupe fluorescent, pour observer les filaments d'actine au microscope à fluorescence.

Dans la cellule, l'assemblage et le démembrement des filaments d'actine est sous la dépendance de **protéines se fixant à l'actine** (figure 11.5). Qu'elles séquestrent les protomères d'actine ou qu'elles s'attachent aux bouts des filaments d'actine, ces protéines empêchent ceux-ci de croître. La régulation de la polymérisation de l'actine par ces protéines permet à la cellule d'entretenir un volant de réserve d'actine protomérique nettement plus élevé (vers les 100 µM) que la concentration critique de monomères d'actine nécessaire à la polymérisation *in vitro* (vers les 2 µM) ; la cellule dispose donc d'une réserve de protomères d'actine au moment où elle doit fabriquer des filaments.

Figure 11.5
Influence des protéines se fixant à l'actine sur l'assemblage et le démembrement d'un filament d'actine. La thymosine et la profiline sont des protéines qui s'attachent aux protomères d'actine et modifient leur polymérisation. Thymosine et profiline séquestrent les monomères chargés d'ADP et les empêchent de rejoindre un filament. En outre, en stimulant l'échange ATP/ADP, la profiline accélère la polymérisation des protomères. D'autres protéines fixées à l'actine démembrent les filaments ou coiffent leurs extrémités ; la gelsoline, par exemple, sectionne les filaments puis s'attache aux bouts plus ainsi formés, les empêchant de s'allonger.

La plus abondante des protéines se fixant à l'actine est la **thymosine**, une petite protéine de 5 kDa, qui s'avère la principale responsable de la séquestration des protomères d'actine et, ce faisant, de leur assemblage en filament. Une autre protéine se fixant à l'actine, la **profiline**, se fixe aussi à l'actine protomérique et l'empêche de rejoindre les filaments. Cependant, la profiline, en stimulant l'échange ATP-ADP sur les protomères, favorise l'incorporation de protomères aux filaments ; cet échange produit des protomères d'actine-ATP, qui, on l'a vu, s'associent plus rapidement aux filaments. La profiline s'attache aussi à des phospholipides de la membrane plasmique (phosphatidylinositides) impliqués dans les messageries cellulaires (exposées au chapitre 13), suggérant que la profiline, en modulant la polymérisation de l'actine, pourrait modifier le cytosquelette en réponse à des signaux extracellulaires.

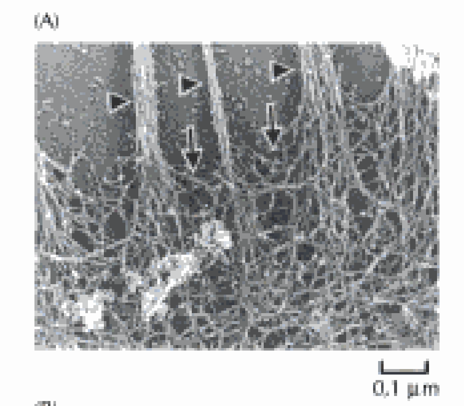
L'assemblage des filaments d'actine est aussi modulé par des **protéines de coiffage** qui couvrent les bouts des filaments, empêchant les protomères d'actine de s'en libérer ou de s'y joindre. En outre, certaines de ces protéines provoquent le démembrement des filaments d'actine ; c'est le cas de la **gelsoline**, une protéine ubiquitaire se fixant à l'actine, qui découpe ses filaments et reste fixée à leur bout plus, formant une coiffe qui les empêche de grandir. Le pouvoir qu'a la gelsoline de fragmenter les filaments d'actine est activé par l'ion Ca^{2+} et sera, par conséquent stimulé par toute une série de signaux qui accroissent momentanément la concentration cytoplasmique de Ca^{2+}. La profiline séquestre aussi, comme la gelsoline, les phosphatidylinositides, qui inhibent son pouvoir de démembrer les filaments et la séparent des filaments d'actine, permettant ainsi aux filaments de reprendre leur croissance. Cette régulation de la gelsoline par Ca^{2+} et les phosphatidylinositides serait un autre moyen de transmettre des signaux extracellulaires au cytosquelette d'actine.

Combinaison des filaments d'actine

Chaque filament d'actine fait partie de deux types de structures, les **câbles d'actine** et les **réseaux d'actine**, qui ont chacun leur rôle dans la cellule (figure 11.6). Dans un câble, les filaments d'actine s'associent étroitement en parallèle, dans un réseau, les filaments sont lâchement pontés plus ou moins perpendiculairement les uns aux autres pour former une trame tridimensionnelle qui possède les propriétés d'un gel semi-solide. La formation de ces structures est commandée par diverses protéines se fixant à l'actine, qui unissent les filaments d'actine en diverses figures.

Toutes les protéines se fixant à l'actine et mises en jeu dans le pontage des filaments possèdent au moins deux domaines qui se fixent à l'actine, ce qui leur permet de rejoindre et souder deux filaments d'actine différents. La nature de l'association entre les filaments est ainsi fixée par la taille et la forme des protéines de pontage (voir figure 11.6). Les protéines qui rassemblent les filaments d'actine en câble (**protéines de compactage de l'actine**) sont généralement de petites protéines rigides, qui forcent les filaments à s'aligner étroitement les uns contre les autres ; les protéines qui joignent les filaments d'actine en réseau sont plutôt de grandes protéines flexibles qui réticulent des filaments qui se croisent. Ces protéines de réticulation de l'actine sont des protéines composées de modules de structure apparentée. Les domaines

(A)



(B)

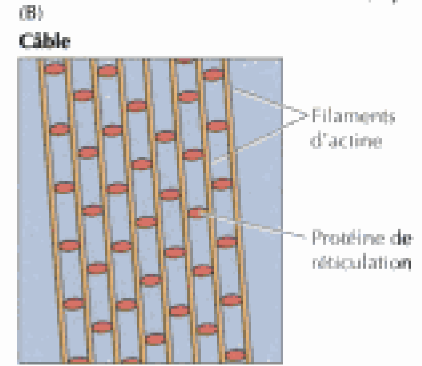


Figure 11.6
Câbles et réseaux d'actine. (A) Micrographie électronique de câbles d'actine (pointes de flèche) soutenant la membrane plasmique d'un macrophage. Les câbles soutiennent des excroissances de la surface cellulaire appelées spicules et filopodes (voir figure 11.17). (B) Structure schématique de câbles et de réseaux. Les filaments d'un câble sont réticulés en parallèle par de petites protéines qui alignent étroitement les filaments les uns contre les autres. Par contre, les réseaux se constituent grâce à de grandes protéines flexibles qui réticulent des filaments entrecroisés (cliché dû à l'obligeance de John H. Hartwig, Brigham & Women 's Hospital).

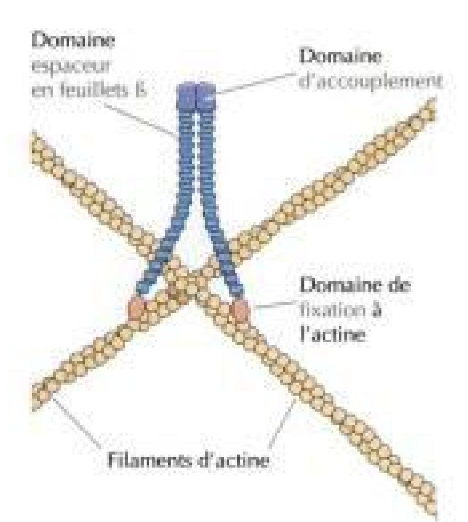


Figure 11.8
Réseaux d'actine et filamine. La filamine est un dimère fait de deux grands protomères (280 kDa), constituant une molécule flexible en forme de V, qui réticule les filaments d'actine entrecroisés en tissu. Le domaine C-terminal de dimérisation est séparé du domaine N-terminal de liaison à l'actine par des modules espaceurs structurés en feuillets β.

L'emploi des globules rouges (érythrocytes) fut particulièrement fructueux dans l'étude de la membrane plasmique (traitée au chapitre suivant) et du cytosquelette cortical. Dans ces études, les érythrocytes ont l'avantage d'être dépourvus de noyau et d'organites internes ; on peut donc isoler leur membrane plasmique et les molécules associées sans risque de contamination par les diverses membranes intracellulaires qui abondent dans les autres types cellulaires ; en outre, puisque les érythrocytes humains sont dépourvus des autres composants cytosquelettiques (microtubules et filaments intermédiaires), c'est au cytosquelette cortical qu'ils doivent leur forme de disque biconcave caractéristique (figure 11.9).

La principale protéine charpentant le cytosquelette cortical des érythrocytes est une protéine se fixant à l'actine, appelée **spectrine**, et apparentée à la filamine (figure 11.10). La spectrine d'érythrocyte est un tétramère formé de deux chaînes polypeptidiques différentes, appelées α et β, de masse moléculaire respective de 240 et 220 kDa. La chaîne β ne porte qu'un seul site de fixation à l'actine, à son bout aminé. Protomères α et β s'accolent côte à côte en dimères, qui se joignent à leur tour tête à tête en tétramère, de sorte que les deux domaines de liaison à l'actine sont distants d'environ 200 nm. Les

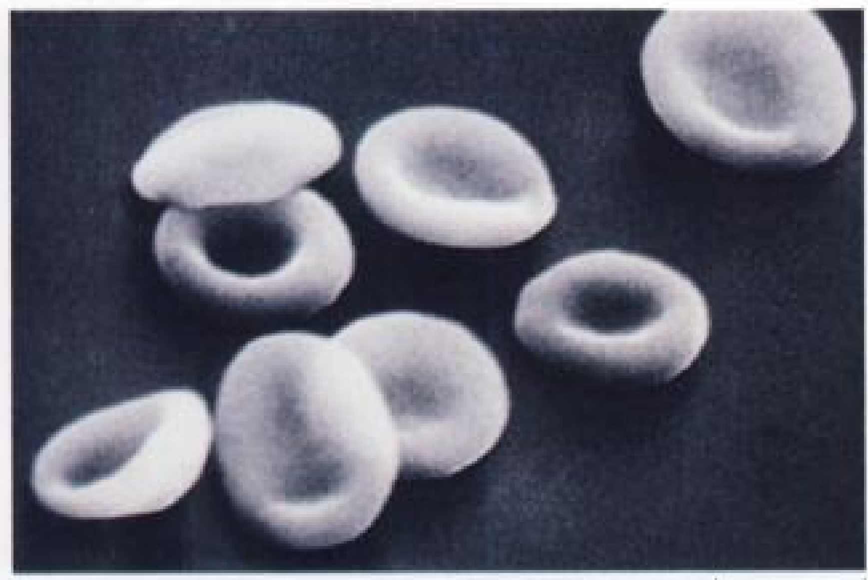


Figure 11.9
Forme du **globule rouge.** Au microscope à balayage, on voit bien la forme biconcave du globule rouge (Omikron/Photo Researchers, Inc).

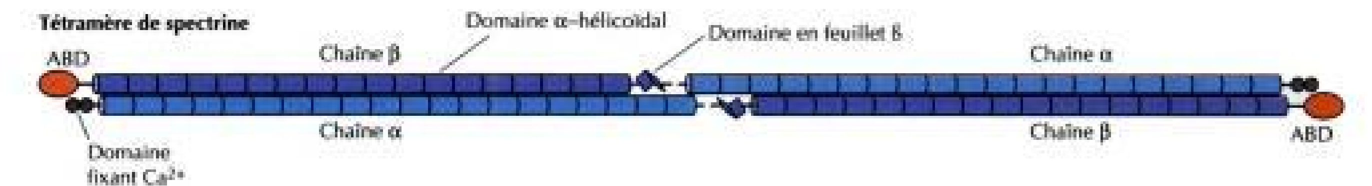
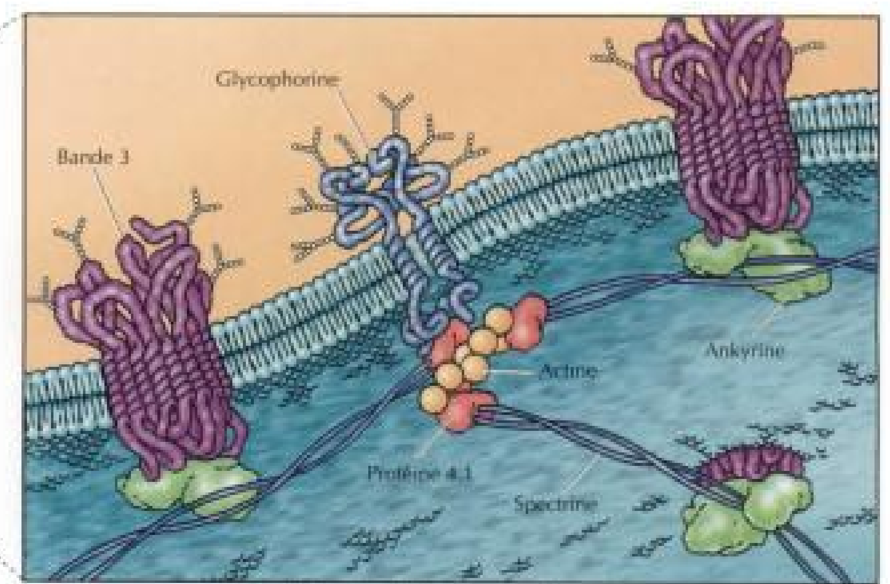


Figure 11.10
Structure de la spectrine. La spectrine est un tétramère formé de deux chaines α et de deux chaînes β. A leur bout aminé, les chaînes β possèdent chacune un seul domaine de liaison à l'actine (ABD). Les chaînes α et β comportent plusieurs domaines espaceurs α-hélicoïdaux, qui séparent les deux domaines de fixation à l'actine du tétramère. La chaîne α comporte deux domaines séquestrant Ca^{2+} à son bout carboxyle.

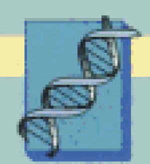
bouts des tétramères de spectrine s'associent alors à de courts filaments d'actine pour former le réseau spectrine-actine qui constitue la charpente cytosquelettique de l'érythrocyte (figure 11.11). La principale copule entre le réseau de spectrine-actine et la membrane plasmique est une protéine appelée **ankyrine**, liée à la fois à la spectrine et au domaine cytoplasmique d'une abondante protéine transmembranaire appelée protéine de la bande 3 ; un autre lien entre le réseau de spectrine-actine et la membrane plasmique serait fourni par la protéine 4.1, qui non seulement se fixe aux jonctions spectrine-actine, mais reconnaît aussi le domaine cytoplasmique de la protéine de la bande 3 et la glycophorine (une autre protéine transmembranaire abondante).

Dans d'autres types cellulaires, les jonctions entre le cytosquelette cortical et la membrane plasmique ressemblent à celles trouvées dans le globule rouge. Les protéines apparentées à la spectrine (la spectrine des cellules non érythroïdes est la **fodrine**), l'ankyrine et la protéine 4.1 s'expriment dans de nombreux types cellulaires, où elles rempliraient le même rôle que celui décrit dans l'érythrocyte. Dans les plaquettes, par exemple, la filamine, une protéine apparentée à la spectrine (voir figure 11.8), constitue la soudure principale entre les filaments d'actine et la membrane plasmique. Un autre membre des protéines de la famille de la spectrine est la **dystrophine**, très intéressante puisqu'elle est produite par le gène impliqué dans deux sortes de dystrophie musculaire, celle de Duchenne et celle de Becker. Ces maladies congénitales, liées au sexe, aboutissent à une dégénérescence progressive des muscles squelettiques ; les patients atteints de la forme la plus grave (celle de Duchenne) meurent habituellement avant leur vingtième année. Le clonage moléculaire de ce gène a révélé qu'il code une grande protéine (427 kDa) qui fait défaut ou est anormale, respectivement, chez les individus souffrant de dystrophie musculaire de Duchenne ou de Becker ; la séquence de la dystrophine a aussi révélé qu'elle s'apparente à la spectrine, por-

Figure 11.11
Association du cytosquelette cortical de l'érythrocyte avec la membrane plasmique. La membrane plasmique est ancrée à un réseau de tétramères de spectrine réticulés par de courts filaments d'actine reliés *via* la protéine 4.1. Le réseau de spectrine-actine est attaché à la membrane par l'ankyrine, qui s'accole à la fois à la spectrine, et à la très abondante protéine transmembranaire de la bande 3. Une autre soudure dépendrait de l'association de la protéine 4.1 avec la protéine de la bande 3 et avec la glycophorine.



MÉDECINE MOLÉCULAIRE



Dystrophie musculaire et cytosquelette

La maladie

Les dystrophies musculaires forment un groupe de maladies congénitales caractérisées par une dégénérescence progressive des cellules musculaires. La plus courante et la plus sévère est la dystrophie musculaire de Duchenne, qui touche près d'un garçon sur 3 500. Les enfants atteints de DMD sont normaux jusqu'à l'âge de 3 à 5 ans, quand ils commencent à souffrir de faiblesse musculaire ; la perte musculaire progresse inéluctablement, confinant l'enfant au fauteuil roulant dès l'âge de 12 ans et le menant à l'issue fatale à la suite d'une détresse respiratoire à la fin de l'adolescence. La dystrophie musculaire de Becker (DMB) est plus rare, elle frappe un garçon sur 30 000 ; elle est moins grave cependant et nombre d'individus atteints de DMB vivent une vie normale sans grandes privations de liberté.

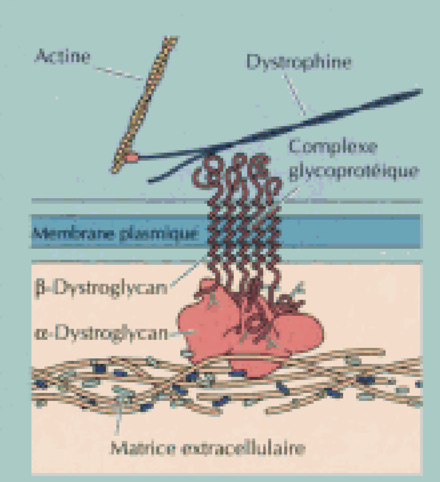
Bases moléculaire et cellulaire

La bien plus grande fréquence des DMD et DMB chez les garçons suggéra d'abord que ces deux maladies sont dues à des gènes récessifs liés au sexe ; cette hypothèse fut confirmée par des études de génétique, qui localisèrent le gène responsables des DMD et DMB dans une région déterminée du chromosome X ; le groupe de Lou Kunkel et celui de Ron Worton clonèrent le gène en 1986 d'après sa position sur le chromosome ; le décryptage de sa séquence montra qu'il code une protéine de 427 kDa, appelée dystrophine et apparentée à la spectrine. La dystrophine est attachée à la membrane plasmique de la cellule musculaire *via* un complexe de protéines transmembranaires ; comme celles-ci s'attachent, elles, à des composants de la matrice extracellulaire, la dystrophine joue un rôle unique, en arrimant le cytosquelette de la cellule musculaire à la matrice extracellulaire. Cet ancrage stabiliserait la membrane plasmique et permettrait à la cellule de soutenir la tension résultant de la contraction musculaire. La conséquence de la mutation DMD ou DMB est soit l'absence de dystrophine, soit l'expression d'une dystrophine anormale, respectivement, en accord avec la gravité respective des DMD et DMB chez l'Homme.

Prévention et traitement

L'identification du gène des DMD/DMB mena à la mise au point de test de diagnostic sensibles, comme la mise en évidence de mutations au moyen de la duplication en cascade par la polymérase ; cela permet d'identifier les femmes portant les allèles mutants du gène DMD/DMB, puis de vérifier pendant leur grossesse si le gène mutant a été transmis au fœtus. Vu la sensibilité du test à la polymérase, on sait tout autant découvrir les mutations chez le jeune embryon obtenu par fécondation *in vitro* avant de le réintroduire dans l'utérus d'accueil. En combinant conseil en génétique et diagnostic prénatal, on peut donc empêcher la transmission des DMD/DMB aux descendants.

Cependant, l'efficacité de cette méthode est limitée puisque dans près d'un tiers des cas les DMD/DMC ne sont pas héréditaires, mais résultent de mutations nouvelles ; l'analyse génétique est sans secours et seule une thérapie peut servir. Les efforts actuels se portent sur une thérapie génique consistant à réexprimer la dystrophine dans le muscle ou à accroître l'expression d'autres protéines apparentées à la dystrophine, qui pallieraient l'absence de cette dernière. Si le but final des recherches futures est de traiter la dystrophie musculaire, le fait de saisir sa cause moléculaire a révolutionné son diagnostic et permis une approche rationnelle dans la mise au point de thérapeutiques modernes.



La dystrophine s'attache à l'actine et à un complexe de protéines transmembranaires, qui arriment le cytosquelette de la cellule musculaire à la matrice extracellulaire.

tant un seul domaine de liaison à l'actine à son bout aminé et, à son bout carboxyle, un domaine de fixation à la membrane. La dystrophine forme, comme la spectrine, des dimères qui unissent les filaments d'actine aux protéines transmembranaires de la membrane plasmique de la cellule musculaire ; à leur tour, ces protéines transmembranaires arriment le cytosquelette à la matrice extracellulaire, qui remplit un rôle crucial de stabilisation cellulaire pendant la contraction musculaire.

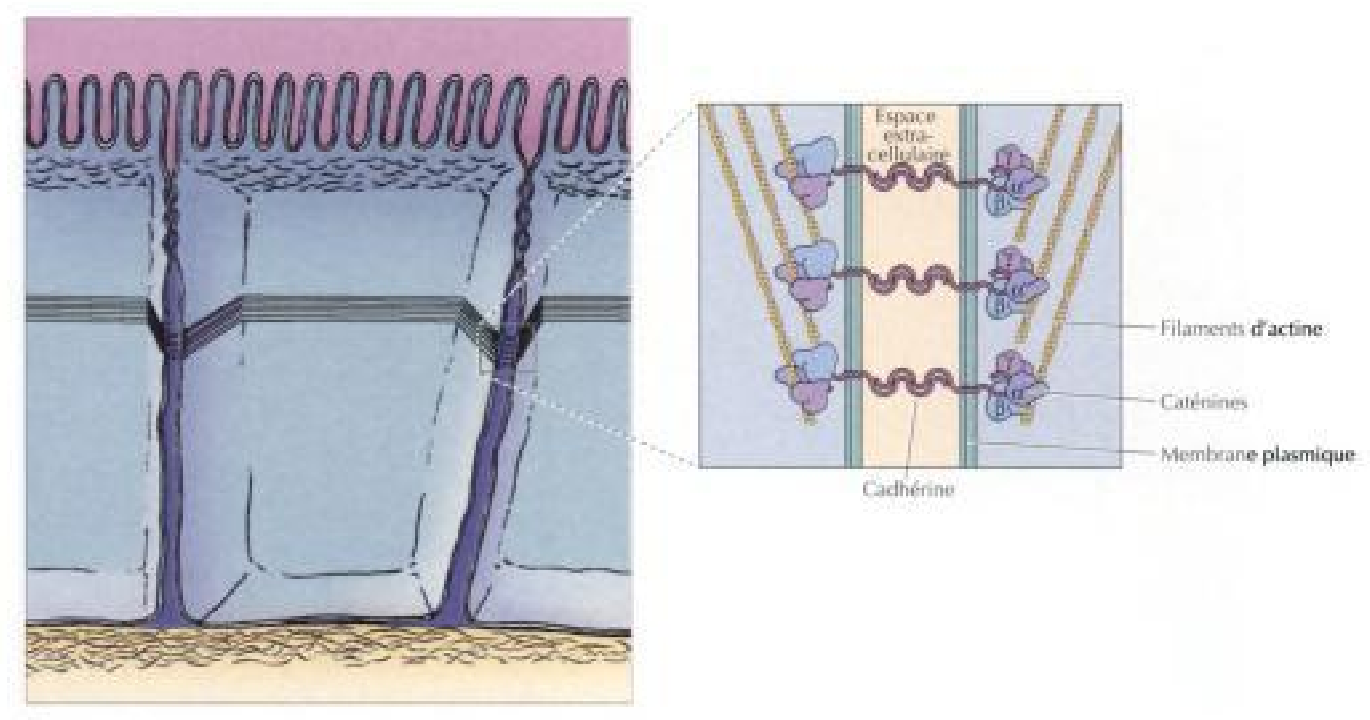


Figure 11.14
Ancrage des faisceaux d'actine aux jonctions étanches. Deux cellules adossées l'une à l'autre au niveau de jonctions étanches sont soudées par des cadhérines, qui servent de sites d'ancrage aux faisceaux d'actine. Dans les feuillets épithéliaux, ces jonctions forment une ceinture continue de filaments d'actine sur la circonférence de chaque cellule. Les cadhérines sont des protéines transmembranaires qui fixent les caténines (variétés α, β et γ) à leur domaine cytoplasmique. Les caténines β et γ se lieraient à la fois à la cadhérine et à la caténine α, qui, elle, sert de pont avec les filaments d'actine.

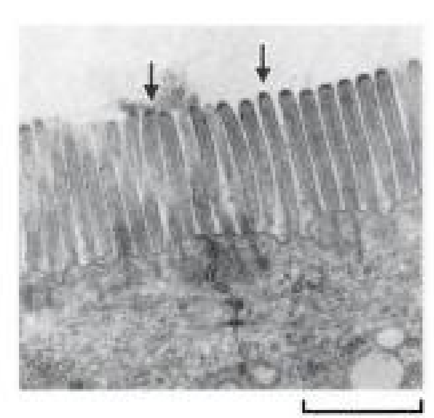
Saillies à la surface de la cellule

La surface de la plupart des cellules porte des prolongements impliqués dans les mouvements cellulaires, la phagocytose ou des fonctions spécialisées comme l'absorption de nutriments. Pour la plupart, ces prolongements superficiels sont soutenus par des filaments d'actine arrangés en câbles ou en faisceaux assez stables ou alors rapidement remaniés.

Parmi ces prolongements superficiels à base d'actine, les mieux connus sont les microvilli, des prolongements de la membrane plasmique surtout abondants à la surface des cellules effectuant l'absorption, par exemple les cellules de la paroi intestinale (figure 11.15). Les microvilli constituent un manchon à la surface apicale de ces cellules (la **bordure en brosse**) : ce manchon est formé d'environ un millier de microvilli par cellule et accroît la surface absorbante de dix à vingt fois. Outre les microvilli absorbeurs, on connaît aussi, parmi les formes spécialisées de prolongements superficiels, les **stéréocils** des cellules ciliées de l'appareil auditif, qui reçoivent les vibrations sonores.

Vu leur abondance et la facilité de leur purification, on connaît en détail la structure des microvilli intestinaux, soutenus par des faisceaux étroitement compactés de 20 à 30 filaments d'actine parallèles (figure 11.16). Ces filaments sont en partie réticulés par la fimbrine, une protéine rassemblant les filaments d'actine en câbles (décrite plus haut), présente dans les saillies superficielles de plusieurs types cellulaires ; cependant, dans les microvilli, la principale protéine capable de rassembler en câble les filaments d'actine est la **villine**, une protéine de 95 kDa, présente dans les microvillosi-

Figure 11.15
Microvillosités vues au microscope électronique. Les microvilli (flèches) des cellules de l'épithélium intestinal sont des digitations implantées sur la membrane plasmique. Elles sont renforcées par des faisceaux d'actine arrimés à une région dense du cortex appelée réseau terminal. (Fred E. Hossler/Visuals Unlimitted).



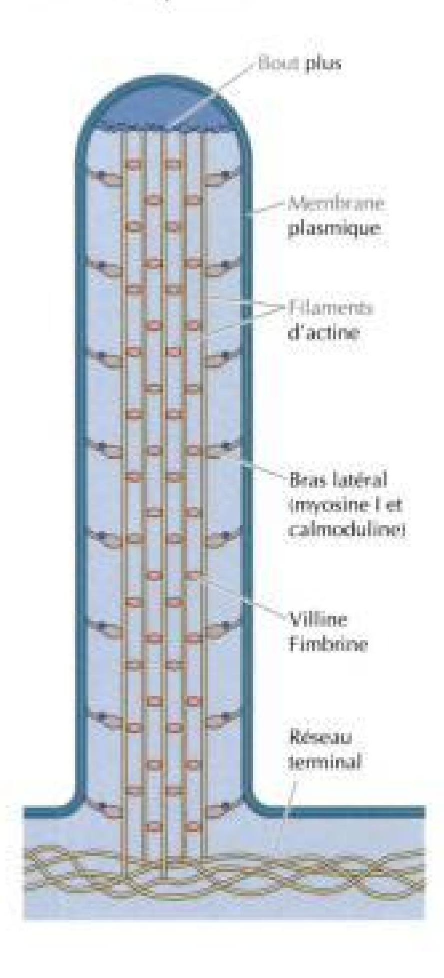


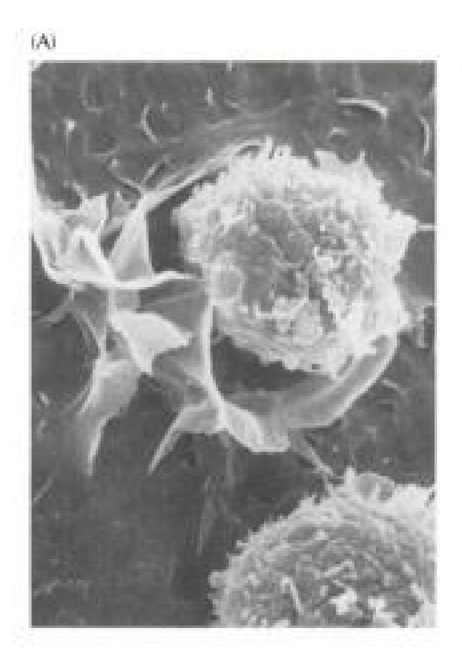
Figure 11.16
Structure d'une microvillosité. Les filaments d'actine de l'âme d'une microvillosité sont réticulés en faisceau très serré par la fimbrine et la villine. Sur toute leur hauteur, ils sont ancrés à la membrane plasmique par des bras latéraux faits de calmoduline et de myosine I. À la pointe de la microvillosité, le bout plus des filaments est noyé dans une coiffe de protéines de nature indéterminée.

tés de quelques types cellulaires seulement, comme ceux de l'épithélium intestinal et des tubules rénaux. Sur leur parcours, les faisceaux d'actine sont reliés à la membrane plasmique par des bras latéraux faits d'une association de calmoduline, un séquestrant du calcium, et de myosine I, censée faire glisser la membrane plasmique sur le faisceau d'actine de la microvillosité. À leur base, les faisceaux d'actine plongent dans une zone du cortex d'actine enrichie en spectrine, le réseau terminal, qui stabilise les microvilli en les réticulant les uns aux autres.

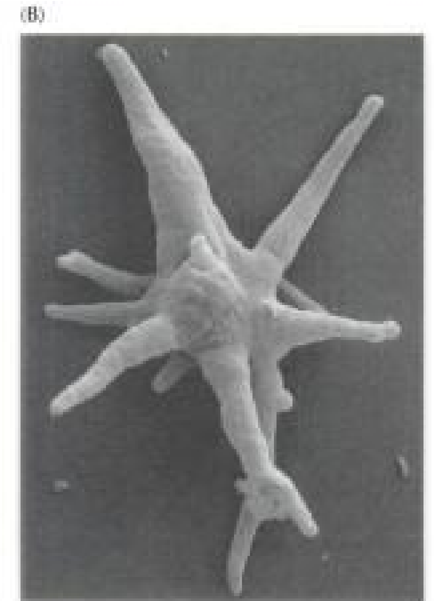
Contrairement aux microvillosités, maintes saillies à la surface cellulaire sont des structures transitoires, formées en réponse à certains stimuli extérieurs. Plusieurs sortes de ces structures naissent du bord avant de la cellule en mouvement et interviennent dans la locomotion (figure 11.17). Les **pseudopodes** sont des prolongements de largeur moyenne, soutenus par des filaments d'actine réticulés en réseau tridimensionnel ; ils servent à la phagocytose et au déplacement des amibes sur un support. Les **lamellipodes** sont de larges protrusions en forme de voile nées du bord avant d'un fibroblaste et soutenues par un réseau de filaments d'actine. Beaucoup de cellules projettent aussi des **filopodes** ou **spicules**, fins prolongements de la membrane plasmique, dont l'âme est un câble d'actine ; leur poussée et leur rétraction dépend de l'assemblage et du démembrement sur commande des filaments d'actine, que nous décrirons dans la section suivante.

Figure 11.17
Quelques types de prolongements superficiels en jeu dans la phagocytose et le déplacement. (A) Pseudopodes d'un macrophage, au microscope à balayage, en train d'engloutir une cellule cancéreuse par phagocytose. (B) Amibe portant quelques longs pseudopodes. (C) Cellule en culture portant des lamellipodes (L) et des spicules (flèche). (A, K. Wasserman/Visuals Unlimited ; B, Stanley Fleger/Visuals Unlimited ; C, Don Fawcett/Photo Researchers, Inc).

(A)



(B)



(C)



ACTINE, MYOSINE ET MOTILITÉ CELLULAIRE

La motilité cellulaire repose généralement sur l'association de l'actine avec la **myosine** ; celle-ci est le prototype du **moteur moléculaire**, c'est-à-dire d'une protéine qui transforme l'énergie chimique de l'ATP en énergie mécanique, donc en force et mouvement. Le plus frappant de ces mouvements est la contraction musculaire, qui nous a servi de modèle pour saisir les interactions actine-myosine et l'activité motrice de la molécule de myosine. Néanmoins, les interactions de l'actine avec la myosine ne conditionnent pas seulement la contraction du muscle, mais aussi divers mouvements des cellules non musculaires, par exemple la division cellulaire ; aussi, ces interactions jouent-elles un rôle central en biologie. Le cytosquelette d'actine est aussi le support des mouvements de reptation de la cellule sur son support, dû directement à la polymérisation de l'actine autant qu'aux interactions actine-myosine.

Contraction musculaire

La cellule musculaire s'est spécialisée dans une seule tâche, la contraction ; c'est pour cette spécialisation structurale et fonctionnelle qu'on la choisit comme prototype dans l'étude du mouvement à l'échelle cellulaire et moléculaire. Les vertébrés possèdent trois types de muscles, le muscle squelettique, responsable de tous les mouvements volontaires, le muscle cardiaque, qui pompe le sang hors du cœur, et le muscle lisse, responsable des mouvements involontaires d'organes comme l'estomac, l'intestin, l'utérus et les vaisseaux sanguins. Dans le muscle squelettique et le muscle cardiaque, les éléments contractiles du cytosquelette sont arrangés en grandes structures très organisées au profil strié caractéristique ; c'est l'étude de ces structures du muscle squelettique qui a forgé notre connaissance, à l'échelle moléculaire, de la contraction musculaire ainsi que des mouvements cellulaires dépendant de l'actine.

Le muscle squelettique est un faisceau de **fibres musculaires**, immenses cellules (d'environ 50 µm de diamètre et dont la longueur peut atteindre plusieurs centimètres) issues de la

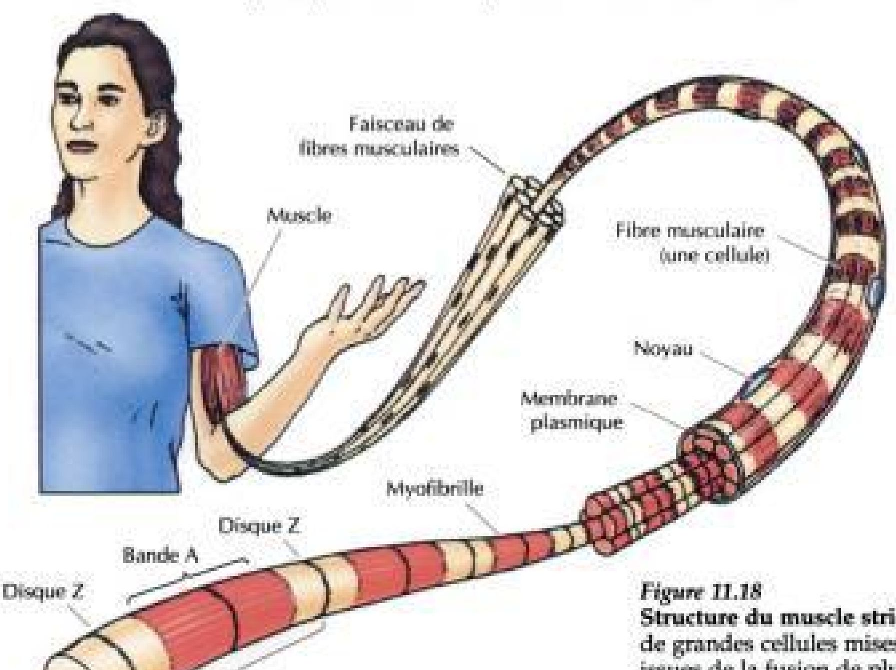


Figure 11.18
Structure du muscle strié. Le muscle se compose de faisceaux de grandes cellules mises bout à bout (les fibres musculaires), issues de la fusion de plusieurs cellules et, pour cette raison, plurinucléées. Chaque fibre renferme de nombreuses myofibrilles, qui sont des faisceaux de filaments d'actine et de myosine arrangés en modules répétitifs qu'on appelle sarcomères.

Figure 11.19
Structure du sarcomère. (A) Micrographie électronique d'un sarcomère. (B) Schéma montrant la disposition des filaments d'actine (minces) et de myosine (épais) dans les zones indiquées. (A, Frank A. Pepe/Biological Photo Service).

fusion de plusieurs cellules au cours du développement embryonnaire (figure 11.18). La plus grande partie de leur cytoplasme est occupé par les **myofibrilles**, des faisceaux cylindriques comportant deux types de filaments, les gros filaments de myosine (de près de 15 nm de diamètre) et les minces filaments d'actine (d'environ 7 nm de diamètre). Chaque myofibrille est une chaîne de modules contractiles, les **sarcomères**, responsables de l'aspect strié des muscles squelettique et cardiaque.

Le sarcomère, long d'environ 2,3 µm, comprend plusieurs zones distinctes, visibles au microscope électronique, dont l'existence a beaucoup contribué à élucider le mécanisme de la contraction musculaire (figure 11.19). Le sarcomère est borné à ses extrémités par le disque Z ; entre elles, on trouve une bande sombre (la bande A, pour bande *a*nisotrope en lumière polarisée) flanquée de deux bandes claires (bandes I, pour *i*sotropes en lumière polarisée) ; cet aspect est dû à la présence ou à l'absence de filaments de myosine. Les bandes I ne contiennent que des filaments minces (actine), la bande A contient aussi des filaments épais (myosine) ; les filaments d'actine s'imbriquent dans les filaments de myosine dans les zones extrêmes de la bande A, alors que leur zone moyenne (la zone H) ne comporte que de la myosine. Les filaments d'actine sont soudés par leur bout plus au disque Z, pourvu de la protéine de réticulation appelée α-actinine. Les filaments de myosine sont soudés à la ligne M qui partage en deux le sarcomère.

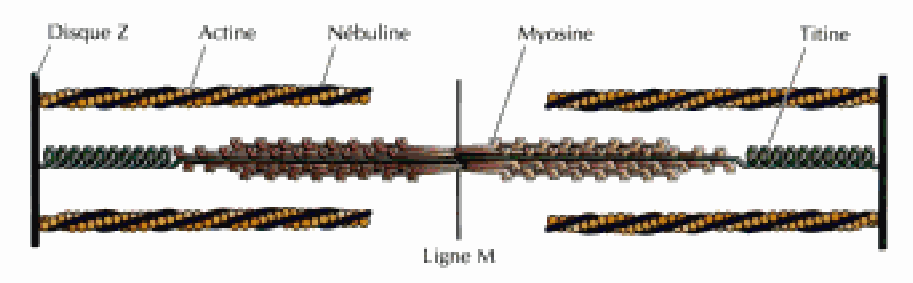


Figure 11.20
Titine et nébuline. Les molécules de titine s'étendent du disque Z à la ligne M et servent de ressort pour maintenir les filaments de myosine au centre du sarcomère. Les molécules de nébuline sont fixées au disque Z et semblent déterminer la longueur des filaments d'actine auxquels elles sont associées.

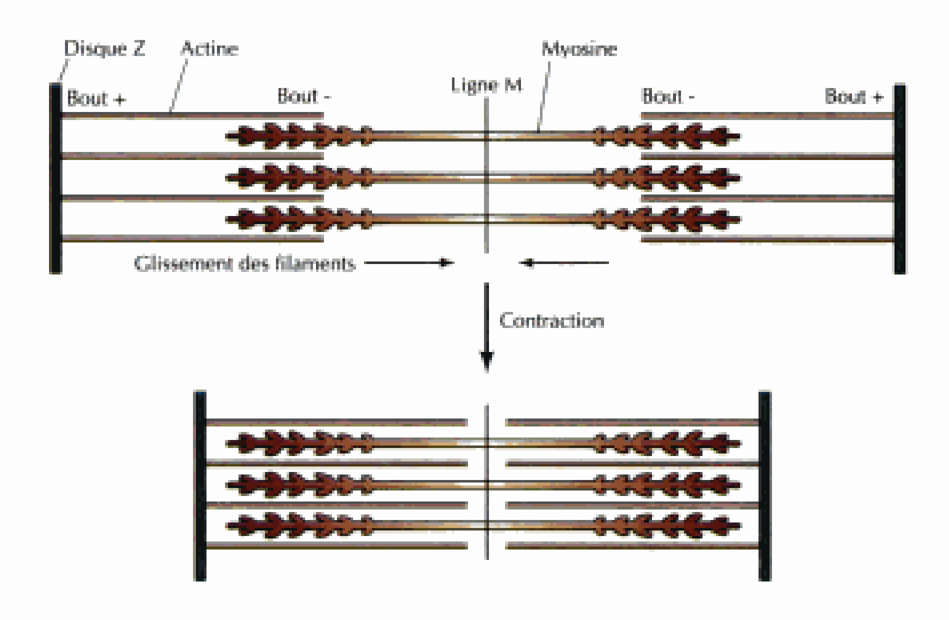


Figure 11.21
Modèle du glissement des filaments dans la contraction musculaire. Les filaments d'actine s'enfoncent entre les filaments de myosine en glissant vers le centre du sarcomère ; il en résulte un raccourcissement du sarcomère, sans variation de longueur d'aucun des filaments.

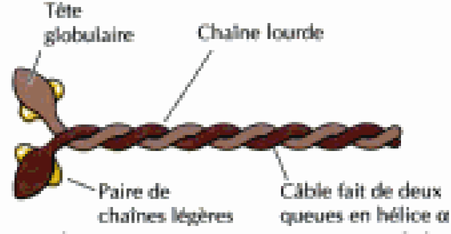
Deux autres protéines, la **titine** et la **nébuline**, contribuent aussi à la structure et à la stabilité du sarcomère (figure 11.20). La titine est une immense protéine (3 000 kDa) qui court de la ligne M au disque Z ; on pense qu'elle agit à la façon d'un ressort pour maintenir les filaments de myosine centrés dans le sarcomère et assurer la tension de repos qui ramène le muscle étiré à sa longueur de relaxation. Les filaments de nébuline s'associent à l'actine ; en limitant, à la façon d'une règle, la longueur des filaments d'actine, ils en fixeraient l'assemblage.

Le nœud de la contraction musculaire est le **modèle du glissement des filaments**, proposé en 1954 par Andrew Huxley et Ralph Niedergerke ainsi que par Hugh Huxley et Jean Hanson (figure 11.21). Pendant la contraction, chaque sarcomère se raccourcit par le rapprochement des disques Z ; on n'observe aucune modification de la bande A, mais la bande I et la zone H s'effacent toutes deux presque entièrement. Cela s'explique si les filaments d'actine et les filaments de myosine glissent les uns sur les autres, les filaments d'actine s'insinuant dans la bande A et la zone H. La contraction consiste donc en une interaction entre filaments d'actine et filaments de myosine imbriqués, qui impose un déplacement des uns par rapport aux autres ; la base moléculaire de ce mécanisme est l'attachement de la myosine aux filaments d'actine, myosine qui joue le rôle d'un moteur moléculaire tirant un filament le long de l'autre.

La myosine contenue dans le muscle squelettique (**myosine II**) est une grande protéine (environ 500 kDa) formée de deux chaînes lourdes identiques (de près de 200 kDa) et de quatre chaînes légères d'environ 20 kDa chacune (figure 11.22). Chaque chaîne lourde comporte une tête globulaire et une longue queue en hélice α ; les longues queues de deux chaînes lourdes sont torsadées l'une autour de l'autre en superhélice, en formant un dimère ; une paire de chaînes légères s'associe à chaque tête de myosine pour compléter la molécule de myosine II.

Les filaments épais du muscle sont formés de centaines de molécules de myosine, accolées parallèlement dans le même sens mais avec un décalage, grâce à l'association de leurs queues (figure 11.23). Les têtes globulaire de myosine s'attachent à l'actine, en formant des ponts entre les filaments épais et les filaments minces. Notons que la polarité des molécules de myosine des filaments épais s'inverse au niveau de la ligne M du sarcomère ; il en va de même de la polarité des filaments d'actine (ancrés par leur bout plus au disque Z), de sorte que leur orientation par rapport aux filaments de myo-

Figure 11.22
Myosine de type II. La molécule de myosine II comporte deux chaînes lourdes et quatre chaînes légères. Les chaînes lourdes possèdent une tête globulaire et une queue en hélice α, qui s'enroule autour de sa voisine en formant un dimère.



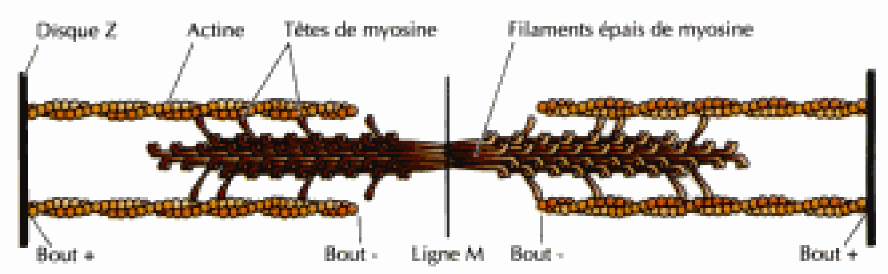
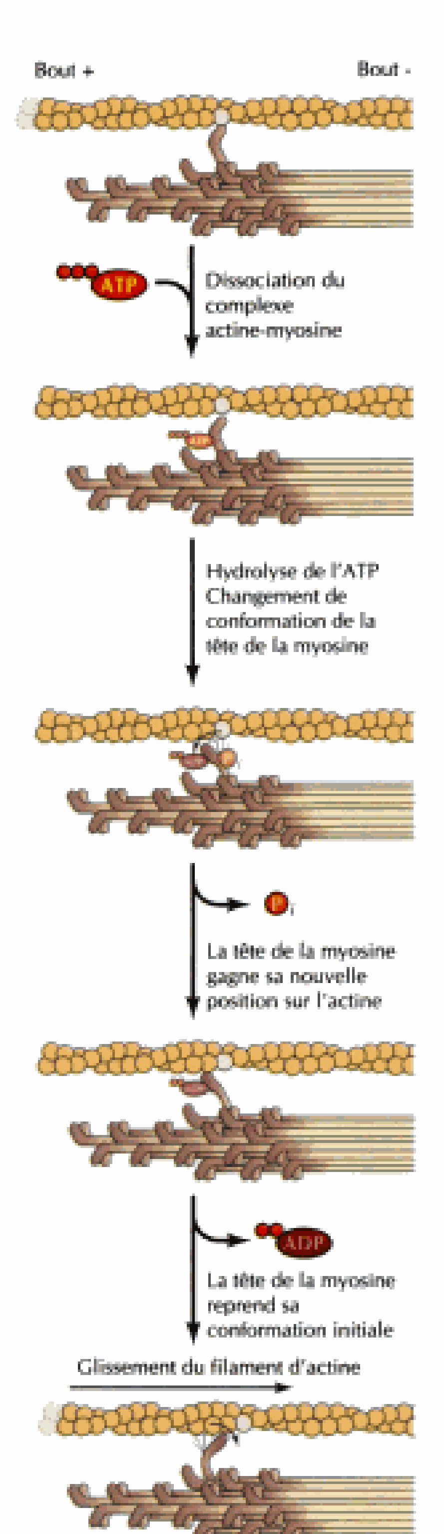


Figure 11.23
Disposition des filaments épais de myosine. Le filament épais consiste en l'association de plusieurs centaines de molécules de myosine II, décalées les unes par rapport aux autres. Les têtes globulaires de la myosine s'attachent à l'actine, pour former les ponts reliant les filaments d'actine à ceux de myosine. L'orientation des filaments d'actine et des filaments de myosine s'inverse au niveau de la ligne M, de sorte que leur polarité relative est la même dans chaque demi-sarcomère.



sine est la même dans chaque demi-sarcomère ; on verra que l'activité motrice de la myosine consiste dans le déplacement de sa tête vers le bout plus du filament d'actine, attirant les filaments d'actine de chaque demi-sarcomère vers la ligne M. Ce rapetissement du sarcomère est l'essence même dans la contraction musculaire.

Outre qu'elles se fixent à l'actine, les têtes de myosine séquestrent l'ATP et utilisent son énergie d'hydrolyse pour faire glisser un filament sur l'autre. Cette mutation d'énergie chimique en mouvement provient de la transconformation que subit la myosine quand elle fixe un ATP ; le modèle le plus courant, celui du " bateau à rames ", propose que l'énergie d'hydrolyse de l'ATP entraîne des cycles successifs d'interaction entre les têtes de myosine et l'actine ; le changement de conformation de la myosine accompagnant chaque cycle provoque le déplacement de la tête de myosine sur le filament d'actine (Voir Domiguez, 1998).

Si on ne connaît pas encore complètement ce mécanisme moléculaire, un schéma plausible du fonctionnement de la myosine a été bâti sur l'étude *in vitro* du mouvement de la myosine le long d'un filament d'actine (astuce expérimentale mise au point par James Spudich et Michael Sheetz) ainsi que sur la résolution de la structure tridimensionnelle de la myosine par Ivan Rayment et son école (figure 11.24). Le cycle démarre avec la myosine (dépourvue d'ATP) fermement liée à l'actine. L'arrivée de l'ATP dissocie le complexe actine-myosine et son hydrolyse provoque dans la myosine un changement de conformation qui semble pousser de 10 nm en avant la tête de la myosine. Les produits d'hydrolyse (ADP et P_i) restent séquestrés par la tête de la myosine, dont la position est dite " armée ". La tête de la myosine gagne alors une autre place sur le filament d'actine et libère son P_i ; ceci engendre le " coup de pouce ", au cours duquel l'ADP est libéré et la tête de la myosine reprend sa conformation initiale ; l'ensemble du processus a tiré le filament d'actine vers la ligne M du sarcomère.

La contraction du muscle squelettique est enclenchée par des influx nerveux qui déclenchent la libération d'ions Ca^{2+} par le **réticulum sarcoplasmique**, un réseau singulier de membranes internes, semblables au réticulum endoplasmique, qui accumule de grandes concentrations d'ions Ca^{2+} ; leur libération par le réticulum sarcoplasmique fait passer de 10^{-7} M à 10^{-5} M la concentration d'ions Ca^{2+} du cytosol ; ceci donne le signal de la

Figure 11.24
Modèle du fonctionnement de la myosine. La fixation d'ATP dissocie la myosine de l'actine. L'hydrolyse de l'ATP provoque alors une transconformation qui déplace la tête de la myosine. Ensuite la tête de la myosine se rattache en un autre endroit du filament d'actine et libère P_i. L'ADP est ensuite libéré et le retour de la tête de la myosine à sa conformation première fait glisser le filament d'actine.

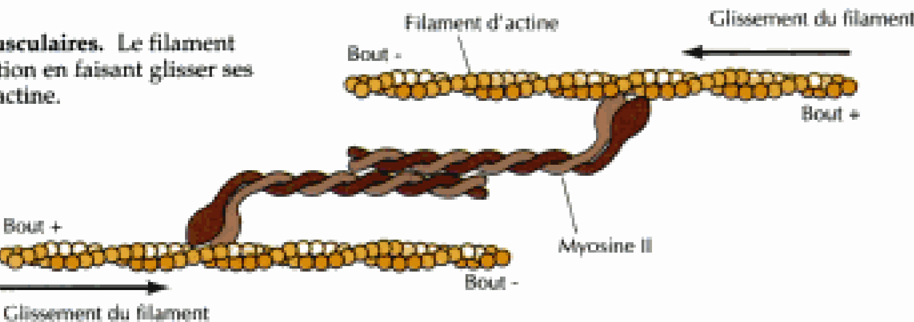
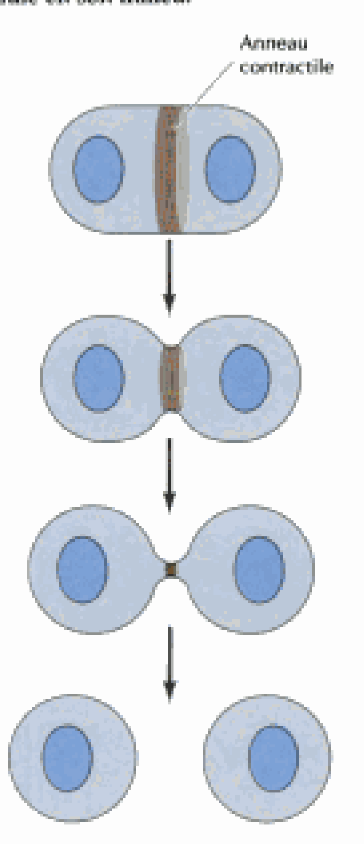


Figure 11.26
Machinerie contractile des cellules non musculaires. Le filament bipolaire de myosine II produit une contraction en faisant glisser ses têtes en sens opposés sur deux filaments d'actine.

tension en travers de la cellule, permettant à celle-ci d'exercer une traction sur un support (matrice extracellulaire, par exemple) auquel elle est arrimée. La contraction des jonctions ceinturantes module la forme d'un feuillet épithélial, un mécanisme primordial du développement embryonnaire, au moment où un feuillet plan prend une forme tubulaire.

Le plus bel exemple de contraction actine-myosine en dehors du système musculaire est cependant celui de la **cytocinèse**, la partition de la cellule en deux à la fin de la mitose (figure 11.27). Quand une cellule animale termine sa mitose, on voit apparaître sous la membrane plasmique un **anneau contractile** constitué de filaments d'actine et de myosine II ; sa contraction déprime progressivement la membrane plasmique au niveau de l'équateur de la cellule, qu'il finit par étrangler en son milieu ; notons que pendant ce processus l'épaisseur de l'anneau contractile ne se modifie pas, ce qui laisse supposer que les filaments d'actine se dépolymérisent au fur et à mesure de la contraction. L'anneau disparaît complètement après la division de la cellule.

Figure 11.27
Cytocinèse. A la fin de la mitose, un anneau contractile fait de filaments d'actine et de myosine étrangle la cellule en son milieu.



Comme on vient de le montrer, la régulation de la contraction du système actine-myosine du muscle strié obéit à la fixation de Ca^{2+} à la troponine ; néanmoins, dans les muscles lisses et les cellules non musculaires, la contraction est surtout enclenchée par la phosphorylation d'une des chaînes légères de myosine, appelée chaîne légère de régulation (figure 11.28). La phosphorylation de la chaîne légère de ces cellules a au moins deux conséquences : elle provoque l'association des molécules de myosine en filaments et accroît l'activité catalytique de la myosine, ce qui amorce la contraction du système. L'enzyme qui catalyse cette phosphorylation, la **kinase de la chaîne légère de myosine**, est lui-même asservi à son association avec la **calmoduline** chargée de Ca^{2+}. Tout accroissement de la concentration du Ca^{2+} cytosolique pousse la calmoduline à se fixer à la kinase et, de ce fait, entraîne la phosphorylation de la chaîne légère de myosine. C'est donc l'augmentation de concentration cytosolique d'ions calcium qui active, indirectement il est vrai, la myosine des cellules non musculaires et celle du muscle lisse, comme c'est le cas dans le muscle strié.

Myosines atypiques

A côté de la myosine II (la classique bicéphale), les cellules non musculaires possèdent aussi d'autres types de myosines. Contrairement à la myosine II, ces myosines atypiques ne forment pas de filaments et n'interviennent pas dans la contraction. Elles entrent cependant en jeu dans tout une série d'autres mouvements cellulaires, tel le transport de vésicules membraneuses et d'organites le long des filaments d'actine, ou la reptation des cellules sur leur support.

Parmi ces myosines particulières, les mieux connues appartiennent à la famille des **myosines I** (figure 11.29). Comme la myosine II, les myosines I possèdent une tête globulaire qui se comporte comme un moteur moléculaire ; cependant, les membres de cette famille de myosines sont des molé-

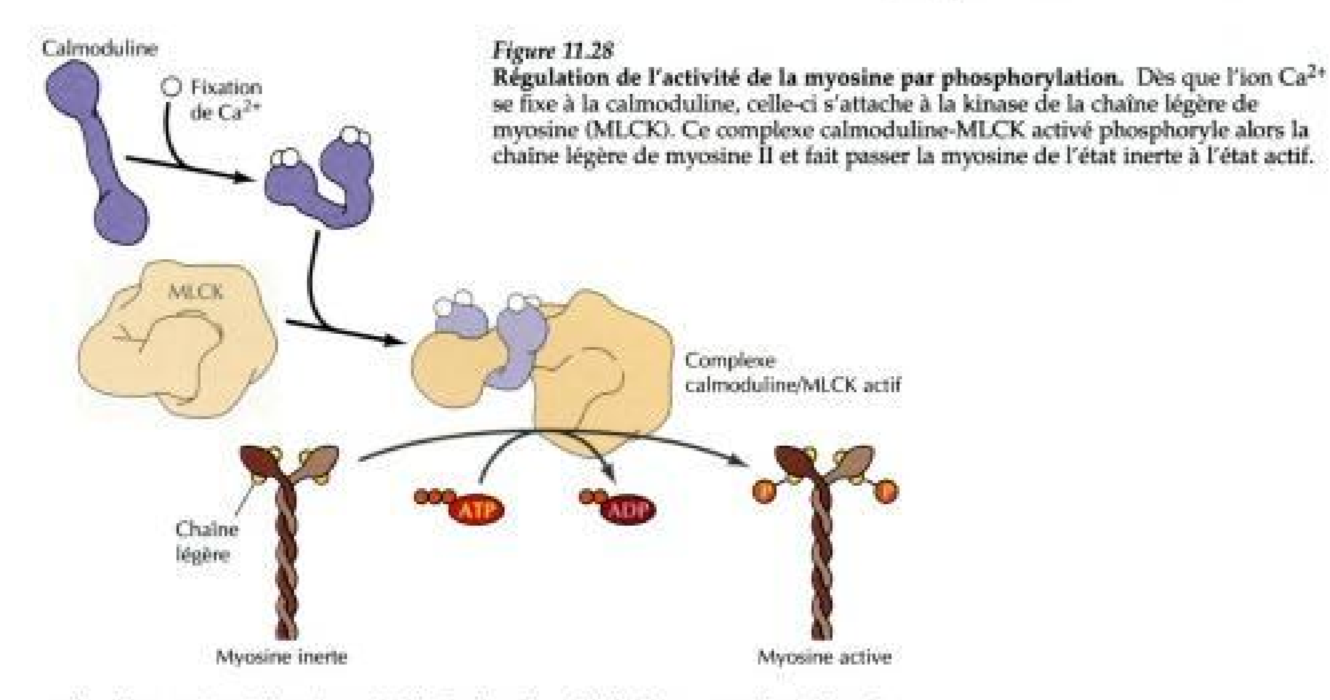


Figure 11.28
Régulation de l'activité de la myosine par phosphorylation. Dès que l'ion Ca^{2+} se fixe à la calmoduline, celle-ci s'attache à la kinase de la chaîne légère de myosine (MLCK). Ce complexe calmoduline-MLCK activé phosphoryle alors la chaîne légère de myosine II et fait passer la myosine de l'état inerte à l'état actif.

cules plus petites (d'environ 110 kDa dans la cellule de mammifère) dont la queue est bien plus courte que celle des myosines II et, ne formant pas de dimère, s'attache à d'autres structures, telles les organites et les vésicules encloses dans une membrane. Le glissement de la myosine I le long d'un filament d'actine peut donc emporter une charge. Un des rôles de la myosine I, déjà évoqué, est de constituer les bras latéraux qui unissent les faisceaux d'actine à la membrane plasmique des microvilli intestinaux (voir figure 11.16). Dans ces structures, l'activité motrice de la myosine I déplace la membrane plasmique le long des faisceaux d'actine, vers la pointe des villosités. La myosine I jouerait encore d'autres rôles, notamment celui de faire glisser les vésicules et les organites le long des filaments d'actine, ou de mouvoir la membrane plasmique lors des déplacements cellulaires, comme on va le montrer.

Outre les myosines I et II, on a découvert au moins neuf autres classes de myosines atypiques (III à XI). La plupart s'expriment dans une même cellule, mais on ignore leur rôle. Un exemple intéressant est celui de la myosine V, connue depuis sa purification biochimique à partir du cerveau de poulet et l'identification des gènes de souris et de levure qui codent des protéines de ce genre. Le transport de vésicules est défectueux chez les levures mutées dans le gène de myosine V, ce qui suggère que le rôle de la myosine V est de déplacer les vésicules le long des filaments d'actine.

Reptation cellulaire

Les mouvements de reptation de la cellule sur un support sont une forme rudimentaire de locomotion, utilisée par un grand nombre d'espèces cellulaires, par exemple les amibes, les cellules embryonnaires au cours de l'organogenèse, les globules blancs gagnant les foyers inflammatoires, les cellules migrant vers les zones à réparer ainsi que la dispersion des cellules cancéreuses donnant naissance à des foyers métastatiques. On observe des mouvements semblables dans la phagocytose et la poussée des prolongements neuronaux lors du développement du système nerveux. Tous ces mouvements sont dus aux propriétés dynamiques du cytosquelette d'actine, bien que le mécanisme détaillé mis en jeu soit encore mal connu.

La reptation cellulaire met en jeu un cycle coordonné de mouvements, qu'on peut séparer en trois stades. Des prolongements, tel les pseudopodes, les lamellipodes ou les spicules (voir figure 11.17) naissent du bord avant de

Figure 11.29
Myosine I. La myosine I comporte une tête semblable à celle de la myosine II, mais sa queue relativement courte ne forme ni dimère ni filament. Bien qu'elle ne provoque pas de contraction, la myosine I glisse le long du filament d'actine (vers son bout plus), véhiculant diverses sortes de charges (telle que vésicules entourées d'une membrane) arrimées à sa queue.

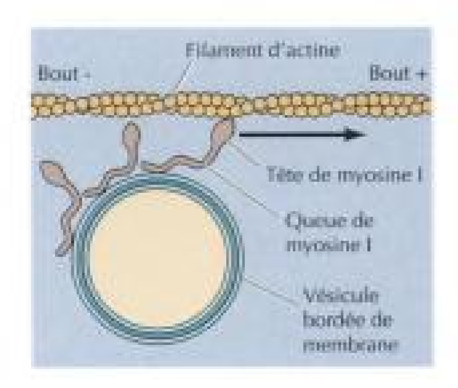


Tableau 11.1 Protéines des filaments intermédiaires

Type	Protéine	Taille (kDa)	Lieu d'expression
I	Kératines acides (~15 protéines)	40-60	Cellules épithéliales
II	Kératines neutre ou basique (~15 protéines)	50-70	Cellules épithéliales
III	Vimentine	54	Fibroblastes, leucocytes et autres types
	Desmine	53	Cellules musculaires
	Protéine acide des fibrilles	51	Cellules gliales
	Périphérine	57	Neurones périphériques
IV	Protéines de neurofilaments		
	NF-L	60-70	Neurones
	NF-M	105-110	Neurones
	NF-H	135-150	Neurones
	Internexine α	66	Neurones
V	Lamines nucléaires	60-75	Lamina nucléaire de tous types de cellules
VI	Nestine	200	Cellules souches du système nerveux central

la structure des cheveux, des ongles et des cornes. Les autres types de kératines I et II (les **kératines souples**) sont abondantes dans le cytoplasme des cellules épithéliales, chaque type de kératine s'exprimant dans tel ou tel type de cellule épithéliale différenciée.

Le type III de protéine de filament intermédiaire comprend la **vimentine**, présente dans toutes sortes de cellules, notamment le fibroblaste, la cellule musculaire lisse et le globule blanc. Une autre protéine de type III, la **desmine**, s'exprime particulièrement dans la cellule musculaire, où elle unit les disques Z de chacun des éléments contractiles. Un autre type III de protéine de filament intermédiaire est particulier aux cellules gliales, un quatrième s'exprime dans les neurones du système nerveux périphérique.

Les protéines de type IV des filaments intermédiaires comprennent les trois **protéines de neurofilaments** (NF-L, NF-M et NF-H, respectivement pour légères, moyennement lourdes et lourdes) ; ces protéines sont les principaux constituants des filaments intermédiaires de toutes sortes de neurones matures. Elles sont particulièrement abondantes dans l'axone des neurones moteurs ; elles joueraient un rôle clé dans le soutien mécanique de ces longs prolongements ténus qui peuvent atteindre plus d'un mètre. Un autre type de protéine IV (l'internexine α) s'exprime à un stade précoce du développement du neurone, avant l'apparition des protéines de neurofilaments. La seule protéine de type VI de filament intermédiaire (la nestine) s'exprime encore plus tôt au cours du développement du neurone, dans les cellules souches du système nerveux central.

Les protéines de type V de filaments intermédiaires sont les lamines nucléaires, présentes chez la plupart des cellules d'eucaryotes ; elles ne font pas partie du cytosquelette, mais appartiennent à l'enveloppe nucléaire (voir figure 8.3). Elles diffèrent encore des autres protéines de filaments intermédiaires en ce qu'elles s'assemblent à angles droits en un filet soutenant la membrane nucléaire.

Malgré leur grande diversité de taille et de séquence d'acides aminés, les protéines de filaments intermédiaires sont, d'où qu'elles proviennent, organisées en une structure commune (figure 11.31) ; toutes comportent un domaine central α-hélicoïdal en bâtonnet d'environ 310 résidus d'acide aminé (350 dans les lamines nucléaires). Ce domaine central est flanqué de domaines aminé et carboxyle qui diffèrent d'une protéine de filament inter-



Figure 11.31
Structure d'une protéine de filament intermédiaire. Les protéines des filaments intermédiaires comportent un domaine central α-hélicoïdal en bâtonnet d'environ 310 résidus d'acide aminé (350 dans les lamines nucléaires). La taille et la forme de la tête N-terminale et de la queue C-terminale sont variables.

médiaire à l'autre par leur taille, leur séquence et leur structure secondaire. Comme nous allons le voir, le domaine α-hélicoïdal en bâtonnet est crucial pour l'assemblage du filament, alors que les domaines singuliers des têtes et des queues déterminent la spécificité de fonction de chaque protéine de filament intermédiaire.

Assemblage des filaments intermédiaires

L'assemblage d'un filament commence par la formation de dimères où les domaines centraux en bâtonnet de deux chaînes polypeptidiques se torsadent l'un autour de l'autre en superhélice, à la manière des queues de myosine II (figure 11.32). Ces dimères s'accolent ensuite bout à bout dans une disposition antiparallèle et avec décalage pour former des tétramères, qui s'empilent tête contre queue pour former les protofilaments. Le filament intermédiaire final contient environ huit protofilaments tordus en câble les uns autour des autres ; comme les filaments proviennent de tétramères faits de modules antiparallèles, leurs extrémités sont équivalentes ; aussi, les filaments intermédiaires sont-ils apolaires, contrairement aux filaments d'actine et aux microtubules qui possèdent un bout plus et un bout moins.

L'assemblage des filaments dépend d'interactions entre types particuliers de protéines de filaments intermédiaires. Les filaments de kératine, par exemple, sont toujours des hétérodimères comportant un polypeptide de type I et un polypeptide de type II. Par contre, les protéines de type III peuvent s'unir en filament formé d'une seule espèce polypeptidique (cas de la vimentine) ou de deux sortes de protéines de type III (par exemple, vimentine et desmine) ; les protéines de type III ne s'associent cependant jamais avec des kératines. Parmi les protéines de type IV, l'internexine α peut former à elle seule des filaments, tandis que les trois protéines de neurofilaments polymérisent de concert en formant des hétéropolymères.

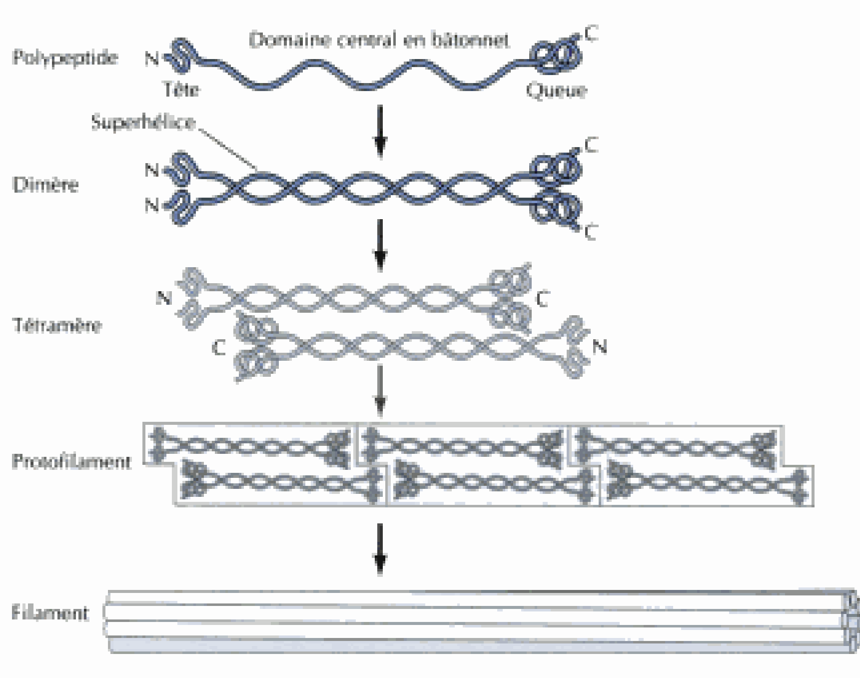


Figure 11.32
Assemblage d'un filament intermédiaire. Le domaine central en bâtonnet d'un polypeptide s'enroule autour de celui d'un polypeptide voisin pour former un dimère en superhélice. Deux de ces dimères s'associent ensuite de manière antiparallèle avec décalage en donnant un tétramère. Les tétramères s'aboutent à la suite l'un de l'autre en protofilaments ainsi que latéralement pour former un filament. Chaque filament contient à peu près huit protofilaments tordus les uns autour des autres en forme de câble.

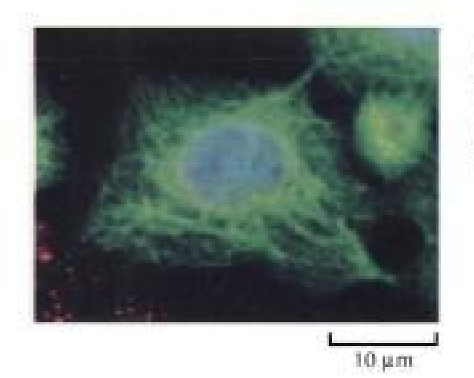


Figure 11.33
Disposition des filaments de kératine dans le cytoplasme. Micrographie de cellules épithéliales colorées par un anticorps fluorescent anti-kératine (en vert). Le noyau est coloré en bleu. Les filaments de kératine s'arriment à un anneau cerclant le noyau et courent jusqu'à la membrane plasmique. (Nancy Kedersha/Immunogen/Photo Researchers, Inc).

Les filaments intermédiaires sont d'habitude plus stables que les filaments d'actine ou les microtubules et ne subissent pas les remaniements dynamiques qui touchent ces deux autres éléments du cytosquelette (par exemple, la chaîne sans fin du filament d'actine représentée dans la figure 11.4). Cependant, les protéines de filaments intermédiaires sont souvent modifiées par phosphorylation, un événement qui module leur assemblage et leur démembrement par la cellule. Le plus clair exemple est la phosphorylation des lamines nucléaires (voir figure 8.29), qui mène au démembrement de la lamina nucléaire et à la désintégration de l'enveloppe nucléaire lors de la mitose. Les filaments intermédiaires cytoplasmiques comme ceux constitués de vimentine sont aussi phosphorylés pendant la mitose, ce qui permet à la cellule en mitose de les dépolymériser et de les réorganiser.

Arrangement des filaments intermédiaires dans la cellule

Les filaments intermédiaires constituent un réseau élaboré dans le cytoplasme de la plupart des cellules, tendu entre la périphérie du noyau et la membrane plasmique (figure 11.33). Tant la kératine que la vimentine s'amarrent à l'enveloppe nucléaire, ce qui sert vraisemblablement à donner au noyau sa place dans la cellule et à l'y maintenir. En outre, les filaments de vimentine peuvent s'associer à la membrane plasmique en s'attachant à l'ankyrine, dont nous avons parlé comme d'un lien entre la membrane et la spectrine. Les filaments de vimentine pourraient donc relier directement le noyau à la membrane plasmique. Ce réseau de filaments intermédiaires est aussi probablement consolidé par association avec des microtubules, car les substances qui provoquent le démembrement des microtubules produisent un effondrement des filaments intermédiaires de vimentine entourant le noyau.

Les filaments kératiniques des cellules épithéliales sont étroitement soudés à la membrane plasmique en deux sites de contacts particuliers, les **desmosomes** et les **hémidesmosomes**. Un desmosome est une jonction entre deux cellules adossées, où les contacts entre cellules se font par le truchement de protéines transmembranaires apparentées aux cadhérines. ; sur sa face cytoplasmique, le desmosome est associé à une plaque dense de protéines intercellulaires, auxquelles s'attachent les filaments de kératine (figure 11.34). Un hémidesmosome est une jonction morphologiquement semblable au desmosome, construite entre une cellule épithéliale et le tissu conjonctif sous-jacent, au niveau duquel les filaments de kératine s'attachent

(A)



(B)

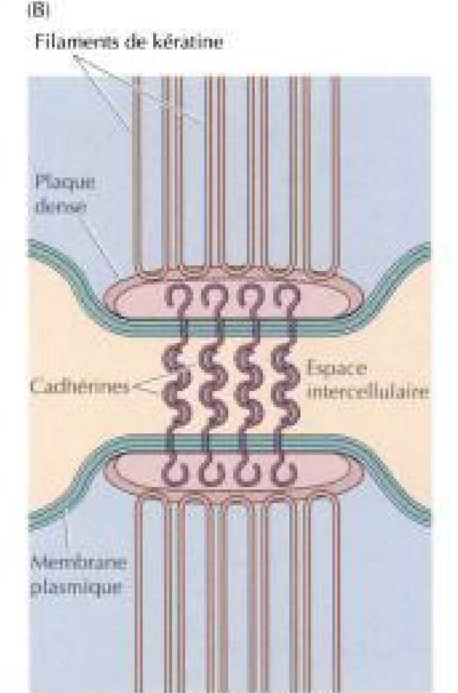


Figure 11.34
Ancrage des filaments de kératine aux desmosomes. (A) Micrographie électronique montrant des filaments de kératine (flèches) attachés aux plaques denses de protéine intracellulaire siégeant sur chaque face du desmosome. (B) Schéma du desmosome. Les filaments de kératine reviennent en boucle sur eux-mêmes à la hauteur de leur site d'arrimage. (A, Don Fawcett/Photo Researchers, Inc).

à un type d'intégrine. Desmosomes et hémidesmosomes arriment donc les filaments intermédiaires à des zones de contact particulières entre cellules ou entre cellule et support, respectivement, qui rappellent l'ancrage du cytosquelette d'actine à la membrane plasmique au niveau des jonctions étanches et des plaques d'adhérence. Retenons que les filaments kératiniques arrimés à chaque face d'un desmosome constituent un lien mécanique entre cellules adjacentes d'un feuillet épithélial, assurant ainsi la résistance mécanique du tissu dans son ensemble.

La desmine et les neurofilaments exercent une fonction particulière, respectivement dans le muscle et le neurone. La desmine soude chaque entité actine-myosine de la cellule musculaire à ses voisines et à la membrane plasmique, synchronisant ainsi l'action des divers éléments contractiles. Les neurofilaments sont les principaux filaments intermédiaires de la plupart des neurones matures ; ils sont particulièrement concentrés dans les longs axones des neurones moteurs ; leur rôle, crucial, serait de soutenir l'architecture de ces fins et longs prolongements cellulaires.

Rôle des kératines et des neurofilaments : maladies de la peau et du système nerveux

Si on supposait depuis longtemps que les filaments intermédiaires servaient de support mécanique à la cellule, on n'a obtenu que tout récemment une preuve directe de leur fonction. Comme certaines cellules en culture ne fabriquent pas de protéines de filaments intermédiaires, il semble que ces protéines ne soient pas indispensables à la prolifération de la cellule *in vitro*. D'autre part, si on injecte des anticorps anti-vimentine à une cellule en culture, on désintègre le réseau de filaments intermédiaires, sans toutefois influencer la prolifération ou les mouvements cellulaires. On a donc pensé que les filaments intermédiaires sont surtout impliqués dans la consolidation du cytosquelette des cellules associées en tissu dans les organismes pluricellulaires, là où elles subissent toutes sortes de tiraillements mécaniques auxquels ne sont pas soumises les cellules abritées dans une boîte de culture.

La preuve expérimentale du rôle joué *in vivo* par les filaments intermédiaires fut apportée en 1991 par les travaux du laboratoire de Elaine Fuchs. Ces chercheurs utilisèrent des souris transgéniques pour chercher l'influence qu'aurait *in vivo* l'expression d'une kératine mutée par délétion, exprimant un polypeptide tronqué qui interférât avec la formation de filaments de kératine normaux (figure 11.35). Chez ces souris transgéniques, ce gène mutant s'exprimait dans les cellules de la couche basale de l'épiderme et empêchait un cytosquelette kératinique normal de s'y former ; elles étaient sujettes à de graves anomalies cutanées, notamment à des bulles dues à une lyse des cellules épithéliales à la suite de légers traumatismes mécaniques, comme un frottement sur la peau. Les anomalies cutanées de ces souris transgéniques prouvaient donc directement le rôle présumé joué par les kératines dans la résistance mécanique dont sont pourvues les cellules des tissus épithéliaux.

Ces expériences révélèrent la base moléculaire d'une affection humaine congénitale, l'épidermolyse bulleuse simple (EBS). Comme la souris transgénique exprimant les gènes de kératine mutés, les patients voient apparaître, au moindre traumatisme cutané, des cloches dues à une lyse cellulaire ; aussi se mit-on à étudier les gènes de kératine chez les patients EBS. On montra que EBS est due à des mutations de gènes de kératines qui interfèrent avec l'assemblage normal des filaments de kératine. Tant l'étude expérimentale des souris transgéniques que l'analyse moléculaire d'une affection humaine congénitale ont prouvé le rôle joué par les kératines dans la résistance que les cellules opposent aux sollicitations mécaniques. D'autres études ont montré que des mutations dans trois autres kératines sont responsables d'au moins trois autres maladies cutanées congénitales, caractérisées elles aussi par une fragilité anormale des cellules épithéliales.

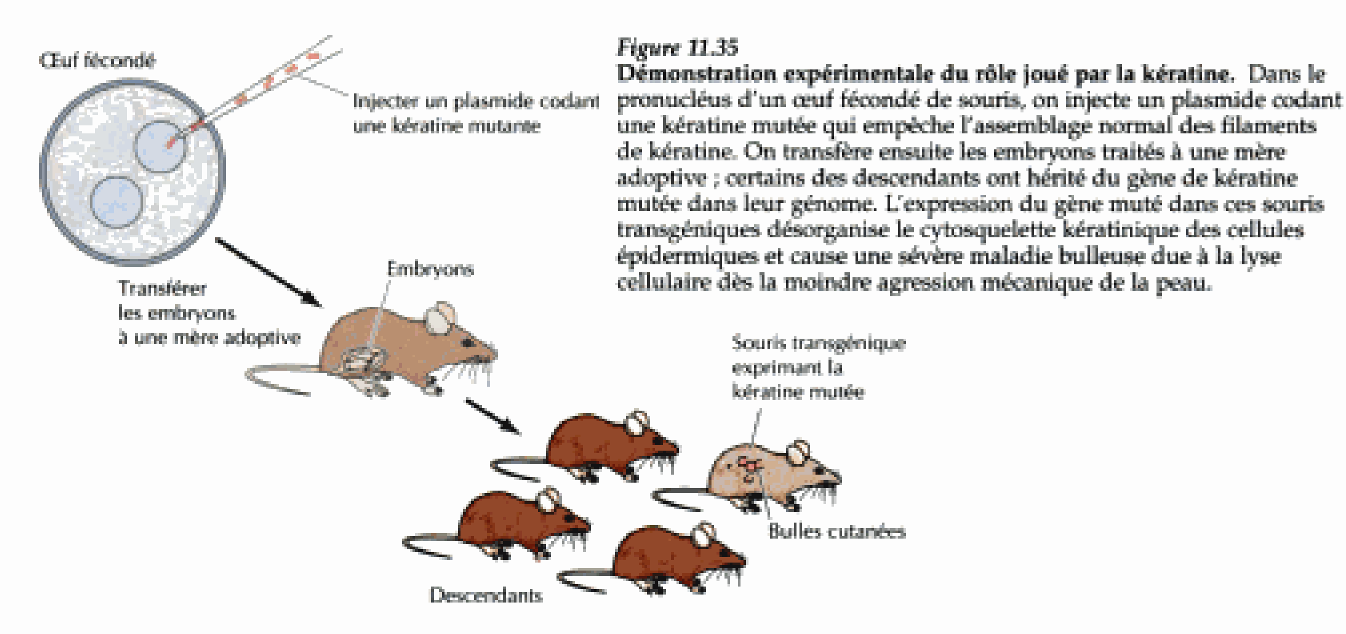


Figure 11.35
Démonstration expérimentale du rôle joué par la kératine. Dans le pronucléus d'un œuf fécondé de souris, on injecte un plasmide codant une kératine mutée qui empêche l'assemblage normal des filaments de kératine. On transfère ensuite les embryons traités à une mère adoptive ; certains des descendants ont hérité du gène de kératine mutée dans leur génome. L'expression du gène muté dans ces souris transgéniques désorganise le cytosquelette kératinique des cellules épidermiques et cause une sévère maladie bulleuse due à la lyse cellulaire dès la moindre agression mécanique de la peau.

D'autres études sur les souris transgéniques ont mis en cause une anomalie des neurofilaments dans des maladies des neurones moteurs, notamment la sclérose latérale amyotrophique (ALS). L'ALS, appelée aussi maladie de Lou Gehrig ainsi que l'affection dont souffre le célèbre physicien Stephen Hawking, sont dues à une perte progressive des neurones moteurs, résultant en une fonte des muscles, une paralysie souvent mortelle. L'ALS et d'autres types de lésion des neurones moteurs se caractérisent par une accumulation et un assemblage anarchique des neurofilaments, ce qui suggère que ces anomalies neurofilamenteuses sont la cause de ces maladies. En accord avec cette thèse, on a observé que l'expression en excès de NF-L ou de NF-H chez la souris transgénique provoquait une maladie semblable à la ALS. Quoique le mécanisme en jeu reste inconnu, ces expériences suggèrent l'intervention des neurofilaments dans la pathogénie des lésions des neurones moteurs.

MICROTUBULES

Les **microtubules**, troisième espèce de composant du cytosquelette, sont des tubes creux, rigides, d'environ 25 nm de diamètre. Comme les filaments d'actine, les microtubules sont des structures dynamiques subissant un continuel assemblage suivi de démembrement dans la cellule. Ils servent à modeler la forme de la cellule et à effectuer divers mouvements cellulaires, comme certains types de locomotion cellulaire, le transport intracellulaire d'organites et la séparation des chromosomes lors de la mitose.

Structure, assemblage et instabilité dynamique des microtubules

Contrairement aux filaments intermédiaires, constitués de plusieurs espèces de protéines fibreuses, les microtubules ne comportent qu'une seule sorte de protéine globulaire, appelée **tubuline**. La tubuline est un dimère composé de deux polypeptides de 55 kDa très semblables, la tubuline α et la tubuline β. Comme l'actine, toutes deux sont codées par de petites familles de gènes apparentés ; il existe en sus un troisième type de tubuline, la tubuline γ, particulière au centrosome, où elle joue un rôle clé, celui d'enclencher l'assemblage des microtubules (nous allons y venir).

Les dimères de tubuline se polymérisent en microtubule ; celui-ci est d'habitude un ensemble de 13 protofilaments rectilignes cerclant une cavité cylindrique (figure 11.36) ; les protofilaments, composés d'une suite de dimères

la tubuline β (pas celui qui est fixé à la tubuline α) est hydrolysé en GDP dès que la molécule de tubuline s'est incorporée à un microtubule ; en affaiblissant l'affinité de liaison de la tubuline, cette hydrolyse favorise la dépolymérisation et conditionne le comportement dynamique du microtubule. Comme c'est le cas des filaments d'actine (voir figure 11.4), le microtubule est soumis au processus du tapis roulant, un remaniement dynamique par lequel les molécules de tubuline chargées d'un GDP quittent l'une après l'autre le bout moins du microtubule pendant que des molécules de tubuline chargées de GTP s'ajoutent l'une après l'autre au bout plus du même microtubule. Dans le microtubule, l'hydrolyse du GTP déclenche une **instabilité dynamique**, un comportement dans lequel chaque microtubule oscille entre un cycle de croissance et un cycle de raccourcissement (figure 11.37), déterminés chacun par le rapport de la vitesse d'addition de la tubuline à la vitesse d'hydrolyse du GTP. Aussi longtemps que la vitesse d'addition de nouvelles molécules de tubuline chargées de GTP dépasse la vitesse d'hydrolyse du GTP, le microtubule porte une coiffe de GTP à son bout plus et continue de s'allonger ; dès que la polymérisation se ralentit, le GTP fixé à la tubuline du bout plus est hydrolysé en GDP ; la tubuline chargée de GDP se dissociant alors, le microtubule se dépolymérise et se raccourcit rapidement.

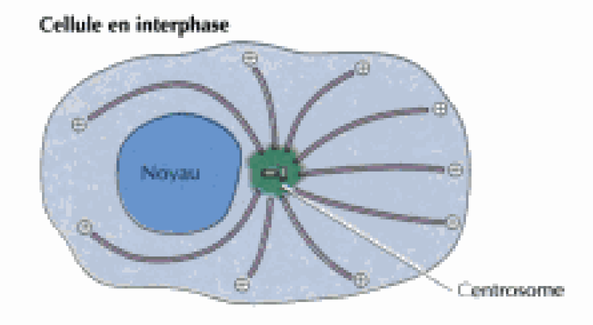
L'instabilité dynamique, décrite par Tim Mitchison et Marc Kirschner en 1984, provoque le remaniement continu et rapide de la plupart des microtubules, dont la demi-vie ne dépasse pas quelques minutes dans la cellule ; comme nous le verrons, ce remaniement rapide des microtubules est essentiel au remodelage du cytosquelette qui a lieu lors de la mitose. Vu le rôle central joué par les microtubules dans la mitose, les substances qui influencent l'assemblage des microtubules sont intéressantes non seulement comme outil d'expérimentation en biologie cellulaire, mais aussi pour traiter les cancers. L'expérimentateur utilise par exemple la **colchicine** et le **colcémide**, qui se fixent à la tubuline, pour empêcher sa polymérisation en microtubules et, ce faisant, bloquer la mitose. Deux autres substances apparentées, la **vincristine** et la **vinblastine**, servent dans la chimiothérapie du cancer, car elles touchent sélectivement les cellules qui prolifèrent rapidement. Un autre médicament très utilisé, le **taxol**, n'agit pas en empêchant l'assemblage de microtubules, mais en les stabilisant, ce qui bloque aussi la mitose ; le taxol s'emploie donc comme anticancéreux et outil expérimental.

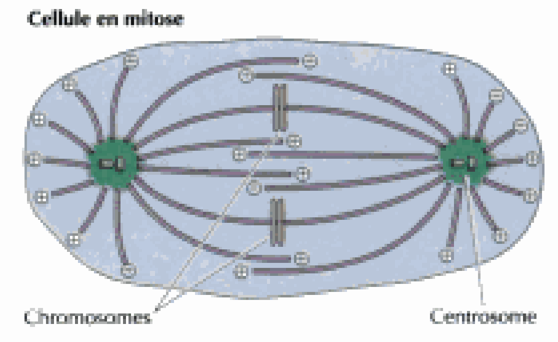
Structure du centrosome et du microtubule

Dans la plupart des cellules, les microtubules rayonnent à partir du **centre organisateur de microtubules**, auquel est arrimé le bout moins des microtubules. Dans les cellules animales, le principal centre organisateur de microtubules est le **centrosome**, accolé au noyau au centre de la cellule en interphase (en dehors des mitoses) (figure 11.38). Pendant la mitose, les microtubules rayonnent, de la même façon, de centrosomes répliqués pour constituer le fuseau mitotique indispensable à la séparation et la répartition des chromosomes aux cellules filles. Le centrosome est donc un élément clé de l'organisation intracellulaire des microtubules, bien que sa fonction reste fort mal connue.

Le centrosome sert à amorcer l'assemblage des microtubules, qui font saillie du centrosome vers la périphérie de la cellule ; on l'observe facilement dans des cellules qu'on a traitées par le colcémide en vue de démembrer leurs microtubules (figure 11.39) ; ce traitement est réversible et, dès l'élimination du poison, on voit de nouveaux microtubules renaître du centrosome. Remarquons que l'amorçage de la croissance d'un

Figure 11.38
Disposition des microtubules dans la cellule. Le bout moins des microtubules est arrimé au centrosome. Pendant l'interphase, le centrosome est proche du noyau et les microtubules pointent vers la périphérie de la cellule. Pendant la mitose, les centrosomes dupliqués se séparent et les microtubules se réorganisent pour former le fuseau mitotique.





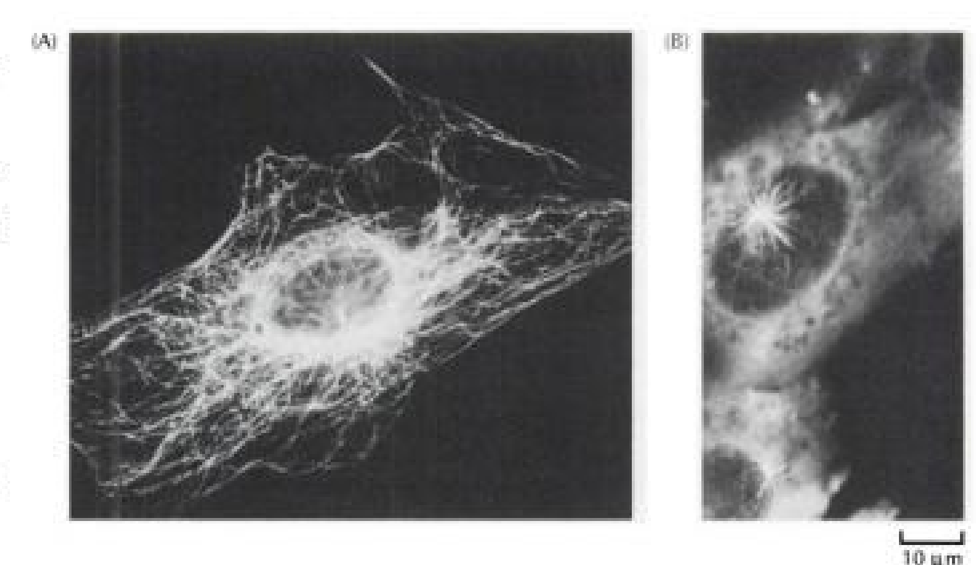
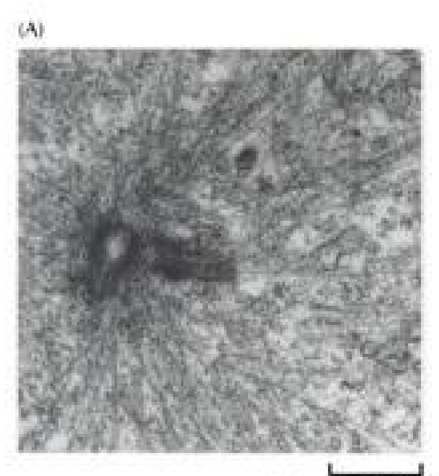


Figure 11.39
Croissance de microtubules sur le centrosome. Grâce à un anticorps anti-tubuline, on a rendu fluorescents les microtubules d'un fibroblaste de souris. (A) Cellule normale en interphase ; vue au microscope à fluorescence. (B) Cellule traitée au colcémide pendant une heure, pour démembrer ses microtubules ; on élimine ensuite le poison et on laisse reposer la cellule pendant 30 minutes, temps nécessaire pour que de nouveaux microtubules se régénèrent sur le centrosome. (D'après M. Osborn et K. Weber, 1976, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **73**:867)

microtubule sur le centrosome fixe la polarité du microtubule dans la cellule ; celui-ci grandit notamment par ajout de tubuline à son bout plus, lequel va s'éloigner du centrosome pour gagner la périphérie de la cellule.

Le centrosome de la plupart des cellules animales contient une paire de **centrioles**, perpendiculaires l'un à l'autre, noyés dans un **matériau péricentriolaire** amorphe (figure 11.40). Le centriole est une structure cylindrique composée de neuf triplets de microtubules, semblables aux corpuscules basaux des cils et des flagelles (voir plus loin dans ce chapitre). Bien que les centrioles semblent être à l'origine des corpuscules basaux, ils n'ont apparemment rien à voir avec le fonctionnement du centrosome ; en effet, ils sont par exemple inutiles à l'assemblage et à l'organisation des microtubules et on n'en trouve ni dans les cellules végétales, ni chez la plupart des eucaryotes unicellulaires, ni dans certaines cellules animales (tel l'ovocyte de souris). Les microtubules qui font saillie du centrosome se fondent non dans le centriole mais dans le matériau péricentriolaire : c'est ce dernier qui amorce l'assemblage des microtubules.

On a identifié plusieurs protéines qui s'associent au centrosome, mais on connaît mal leur rôle, sauf pour la tubuline γ, espèce rare de tubuline découverte chez les champignons ; des travaux ultérieurs ont montré que la tubuline γ se trouve uniquement dans le centrosome de certaines cellules, où il sert à la nucléation des microtubules. Ainsi, quand on introduit des anticorps



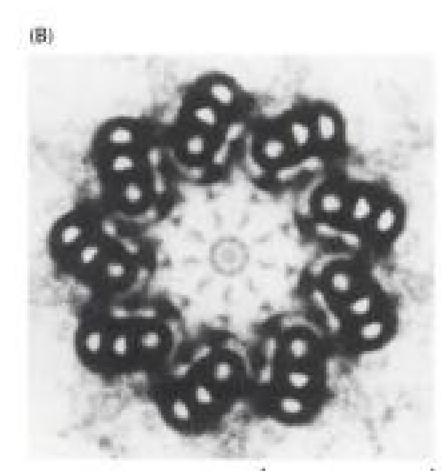


Figure 11.40
Structure du centrosome. (A) Micrographie électronique d'un centrosome avec son éventail de microtubules ancrés dans le matériau péricentriolaire entourant la paire de centrioles. (B) Coupe transversale d'un centriole, montrant les neufs triplets de microtubules. (A, David M. Phillips/Visuals Unlimited ; B, Don Fawcett, Photo Researchers , Inc.).



Figure 11.41
Micrographie électronique d'un fuseau mitotique. Les microtubules du fuseau sont attachés aux chromosomes condensés de la métaphase. (D'après C. L. Rieder & S. Bowser, 1985, *J. Histochem. Cytochem.* **33**:165/Biological Photo Service)

anti-tubuline-γ dans une cellule, on y empêche la nucléation de nouveaux microtubules ; il faut aussi ajouter de la tubuline γ aux extraits acellulaires pour obtenir des centrosomes qui fonctionnent. En outre, les complexes de tubuline γ préparés à partir d'ovocytes de xénope sont capables d'enclencher la croissance des microtubules *in vitro* ; ces complexes sont des structures annulaires, de 25 à 28 nm de diamètre (semblables à ceux du microtubule) et composés de 10 à 13 molécules de tubuline γ ; ils se fixeraient aux tubulines α et β et serviraient de noyaux d'assemblage à de futurs microtubules.

Remodelage des microtubules au cours de la mitose

Comme on l'a mentionné, la cellule réorganise de fond en comble ses microtubules au cours de la mitose, preuve frappante du rôle central que joue leur instabilité dynamique. La charpente de microtubules présente pendant l'interphase se désagrège et les protomères de tubuline libérés se réorganisent pour former le **fuseau mitotique**, responsable de la séparation des chromosomes fils (figure 11.41). Cette refonte du cytosquelette microtubulaire est orchestrée par le doublement du centrosome, qui aboutit à la formation de deux centres organisateurs de microtubules, l'un à chaque pôle du fuseau mitotique.

Le centriole et les autres constituants du centrosome se répliquent dans la cellule en interphase, mais ils restent accouplés contre une des faces du noyau jusqu'au début de la mitose (figure 11.42) ; à ce moment, les centrosomes se séparent et migrent aux pôles opposés du noyau, pour former les pôles de l'appareil mitotique. Dès que la cellule entre en mitose, la dynamique d'assemblage et de démembrement des microtubules est boulever-

Figure 11.42
Formation de l'appareil mitotique. Le centriole et le centrosome se répliquent pendant l'interphase. Lors de la prophase méiotique, ces centrosomes se séparent et migrent aux pôles opposés du noyau ; puis l'enveloppe nucléaire se désagrège et les microtubules se dépolymérisent pour construire l'appareil mitotique. Les microtubules kinétochoriens sont arrimés aux chromosomes condensés, les microtubules polaires s'imbriquent les uns dans les autres au centre de la cellule et les microtubules astraux pointent vers la périphérie de la cellule. Lors de la métaphase, les chromosomes condensés s'alignent sur l'équateur du fuseau.

Cellule en interphase
Noyau en interphase
Réplication du centrosome
Séparation des centrosomes
Condensation de la chromatine
Prophase
Démembrement de l'enveloppe nucléaire
Formation du fuseau mitotique
Métaphase
Microtubules polaires
Microtubules astraux
Microtubules kinétochoriens

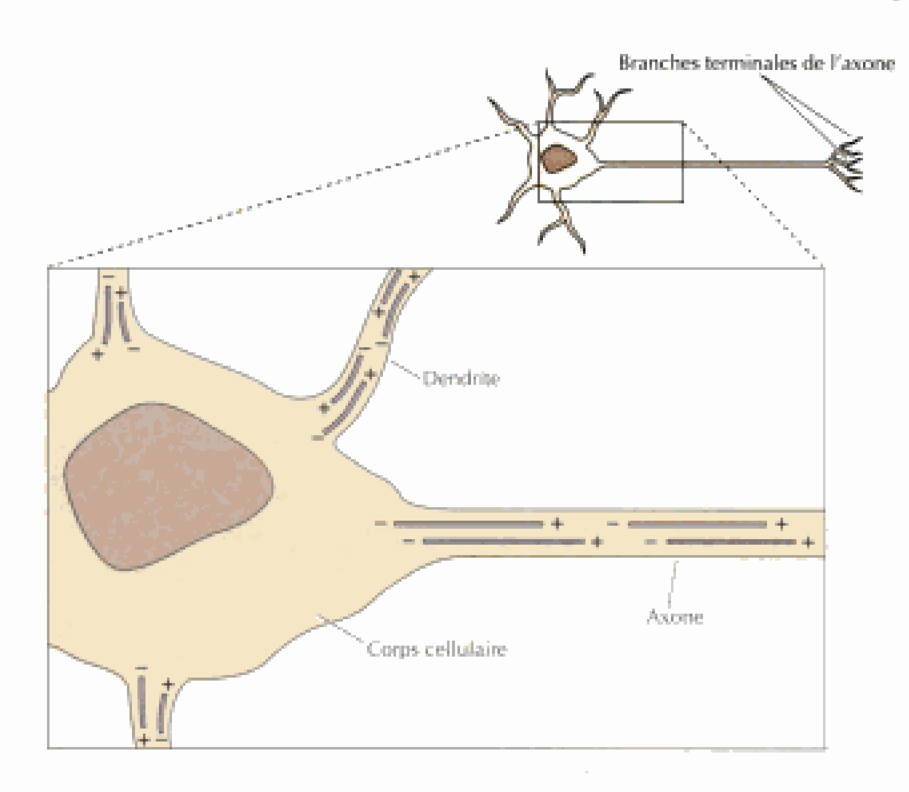


Figure 11.43
Arrangement des microtubules dans un neurone. Le corps cellulaire d'un neurone porte deux types de prolongements. Les dendrites sont de courtes branches qui reçoivent les stimuli d'autres cellules nerveuses ; l'unique long axone conduit les influx issus du corps cellulaire vers d'autres neurones ou vers des cellules effectrices, comme la cellule musculaire. Les microtubules permanents des dendrites et de l'axone se perdent dans le cytoplasme, sans aller s'arrimer au centrosome. Dans les dendrites, on trouve des microtubules tournés dans les deux sens, le bout plus de l'un tourné vers le corps cellulaire, celui d'un autre vers la périphérie de la cellule. Par contre, les microtubules de l'axone ont tous la même orientation, leur bout plus est dirigé vers la pointe de l'axone.

ve des microtubules tournés dans les deux sens : certains bouts plus regardent le corps cellulaire, d'autres pointent vers la périphérie de la cellule. A ces dispositions particulières des microtubules correspondent des différences dans les protéines MAP : l'axone contient la protéine tau, mais pas de protéine MAP-2, tandis que les dendrites contiennent la protéine MAP-2, mais pas de protéine tau.

La différence de distribution de ces protéines MAP-2 et tau suggère que ces protéines associées aux microtubules gouvernent l'arrangement des microtubules permanents soutenant l'axone et les dendrites. En accord avec cette hypothèse, on a montré que si on interfère avec l'expression de tau dans des neurones en culture, on empêche sélectivement la croissance de l'axone ; par contre, quand on fait s'exprimer tau dans des fibroblastes, les microtubules se réorganisent pour soutenir des prolongements ressemblant à des axones. La protéine tau joue donc un rôle direct dans la stabilisation et l'organisation des microtubules de l'axone du neurone, exemple frappant de la fonction qu'exerce une protéine associée aux microtubules dans le modelage et la polarité d'une cellule.

MOTEURS MICROTUBULAIRES ET MOTILITÉ DES MICROTUBULES

Les microtubules sont la source de tout un série de mouvements cellulaires, notamment le transport et la mise en place des vésicules membraneuses et d'organites, la séparation des chromosomes lors de la mitose et le battement des cils et des flagelles. Comme on l'a signalé pour les filaments d'actine au début de ce chapitre, le glissement le long d'un microtubule est dû à l'action d'un moteur moléculaire protéique qui consomme l'énergie d'hydrolyse de l'ATP pour produire une force et un mouvement. Les divers mouvements auxquels participent les microtubules sont entraînés par les **kinésines** et les **dynéines**, des membres de deux grandes familles de moteurs moléculaires.

EXPÉRIENCE CLÉ



Purification de la kinésine

Identification of a Novel Force-Generating Protein, Kinesin, Involved in Microtubule-Based Motility

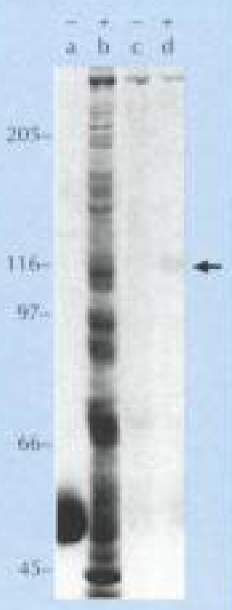
Ronald D. Vale, Thomas S. Reese, and Michael P. Sheetz
National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke, Marine Biological Laboratory, Woods Hole, MA; University of Connecticut Health Center, Farmington, CT; Stanford University School of Medicine, Stanford, CA
Cell, Volume 42, 1985, pages 39-50

Contexte

Comme la morphogenèse des cellules d'eucaryote dépend étroitement du transport et de la mise en place des organites dans le cytoplasme, le biologiste cellulaire doit parfaitement saisir les mécanismes responsables du transport des vésicules et des organites. En 1982, Robert Allen, Scott Brady, Ray Lasek et leurs collaborateurs observèrent au vidéomicroscope le déplacement des organites le long des filaments cytoplasmiques de l'axone géant de calmar, tant *in vivo* que dans un système acellulaire. Au microscope électronique, ils identifièrent alors ces filaments à des microtubules, mais ils ignoraient la nature des moteurs protéiques qui mettaient ces organites en mouvement. Le seul moteur protéique connu à cette époque pour être guidé par des microtubules était la dynéine de l'axonème, présente uniquement dans les cils et les flagelles. En 1985, Ronald Vale, Thomas Reese et Michael Sheetz annoncèrent l'isolement d'un nouveau moteur protéique, la kinésine, dont dépend le glissement des organites le long des microtubules. Scott Brady publia à cette époque des résultats expérimentaux similaires (*Nature* **17** :73-75, 1985).

Preuve expérimentale

Deux dispositifs expérimentaux nouveaux permirent d'isoler la kinésine. Le premier, basé sur le travail de l'école d'Allen, consistait à choisir un système *in vitro* capable de mesurer l'activité du moteur moléculaire ;



Fixation d'un moteur protéique aux microtubules en présence d'AMP-PNP : les échantillons de protéines sont examinés par électrophorèse à travers un gel de polyacrylamide, colorés puis photographiés. Des protéines de calibrage sont séparées en même temps et leur masse moléculaire indiquée en kDa à gauche du gel. La piste *a* correspond à des microtubules purs, constitués uniquement de tubuline (55 kDa). La piste *b* correspond à un extrait de cytoplasme d'axone de calmar, composé de nombreux polypeptides. Les auteurs incubèrent cet extrait soluble avec des microtubules en absence (piste *c*) ou en présence (piste *d*) d'AMP-PNP. Ils séparèrent les microtubules et les incubèrent en présence d'ATP, de façon à libérer les protéines séquestrées, qu'ils soumirent ensuite à une électrophorèse. Notez que le polypeptide de 110 kDa alla s'attacher sélectivement aux microtubules en présence d'AMP-PNP et s'en détacha en présence d'ATP. On montra que les protéines séquestrées en présence d'AMP-PNP et libérées en présence d'ATP induisent le glissement des microtubules (indiqué par le signe + au dessus du gel).

de l'axone ou vers le corps cellulaire. Les vésicules remplies de neuromédiateur, par exemple, sont poussées de l'appareil de Golgi vers les pointes de l'axone par la kinésine ; dans l'autre sens, la dynéine cytoplasmique ramène des vésicules d'endocytose de l'axone au corps cellulaire.

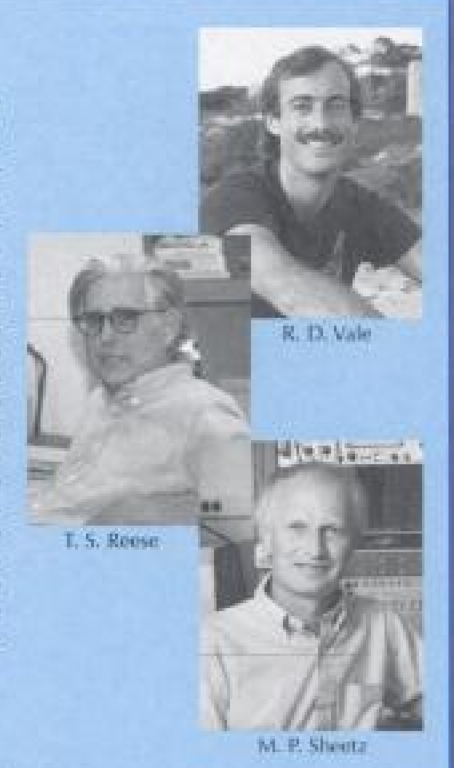
Ce type de transport microtubulaire de vésicules membraneuses et d'organites existe aussi dans d'autres types cellulaires. Comme les microtubules sont généralement orientés avec leur bout moins arrimé au centrosome et leur bout plus tourné vers la périphérie de la cellule, on pense que la kinésine et la dynéine cytoplasmique transportent les vésicules membraneuses et les organites en sens opposé à travers le cytoplasme (figure 11.45). Outre qu'ils transportent les vésicules membraneuses des voies endocytiques et sécrétoires, les microtubules et leurs moteurs moléculaires répartissent dans la cellule les organites bordés de membrane, tels le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi, les lysosomes ; c'est, par exemple, associé à des microtubules que le réticulum endoplasmique s'étend jusqu'à la périphérie

Purification de la kinesine (suite)

Vale, Reese et Sheetz mirent au point un système dans lequel des protéines cytoplasmiques d'axone faisaient glisser des microtubules à la surface d'un couvre-objet en verre. Ce système acellulaire était un test fonctionnel sensible et rapide de l'activité de la kinésine en tant que moteur moléculaire.

L'autre voie d'approche intéressante pour isoler la kinésine profitait du fait que celle-ci se fixait aux microtubules. Lasek et Brady avaient remarqué (*Nature* **316**:645-647, 1985) que les microtubules ne se meuvent *in vitro* qu'en présence d'ATP et qu'on inhibe cette motilité en ajoutant au milieu de l'adénylyl imidodiphosphate (AMP-PNP), un analogue non hydrolysable de l'ATP, qui, cela va de soi, ne fournit pas d'énergie libre. En présence d'AMP-PNP, les organites restent fixés aux microtubules, ce qui suggère que le moteur protéique responsable du glissement des organites reste également fixé aux microtubules dans ces conditions.

Au vu de ces résultats, Vale et son équipe incubèrent des microtubules en présence d'AMP-PNP et de protéines cytoplasmiques d'axone géant de calmar, purifièrent les microtubules puis les mirent en présence d'ATP, de façon à libérer les protéines sélectivement séquestrées en présence de l'analogue non hydrolysable d'ATP. Cette expérience mena à l'isolement d'un polypeptide de 110 kDa, fixé aux microtubules en présence d'AMP-PNP, mais libéré d'eux par incubation subséquente en présence d'ATP (voir figure). Ils montrèrent alors que ces protéines, fixées aux microtubules et détachées en présence d'ATP, provoquaient le glissement des microtubules *in vitro* ; pour isoler les moteurs moléculaires, il suffisait donc de les fixer aux microtubules en présence d'AMP-PNP : l'examen biochimique montra que ce moteur protéique se composait d'un polypeptide de 110 kDa associé à des polypeptides de 60 à 70 kDa. Une approche identique permit ensuite d'isoler le moteur moléculaire à partir de cerveau de bœuf. Les auteurs " concluent que ces protéines appartiennent à une nouvelle classe de moteurs moléculaires protéiques, distincte de la dynéine par leur structure et leurs propriétés enzymatiques, raison pour laquelle nous proposons de donner à ces moteurs moléculaires le nom de kinésine (du grec κινειν, mouvoir) ".



Portée de la découverte

Comme le déplacement des vésicules et des organites le long des microtubules est la clé de la morphogenèse des cellules d'eucaryote, les moteurs protéiques qui effectuent ces déplacements sont des facteurs essentiels de la biologie cellulaire. Des expériences ultérieures prouvèrent, dans des systèmes *in vitro* semblables à ceux décrits ci-dessus, que la kinésine glisse vers le bout plus du microtubule, alors que la dynéine cytoplasmique pousse les vésicules et les organites vers le bout moins du microtubule. On a identifié encore tout une famille de protéines apparentées à la kinésine. Outre leur rôle dans le transport de vésicules et d'organites, certains membres de ces familles de moteurs moléculaires concourent à la séparation et au partage des chromosomes mitotiques. L'identification de la kinésine permit d'expliquer tout une série de déplacements sur les microtubules, qui sont essentiels à la structure et au fonctionnement de la cellule eucaryotique.

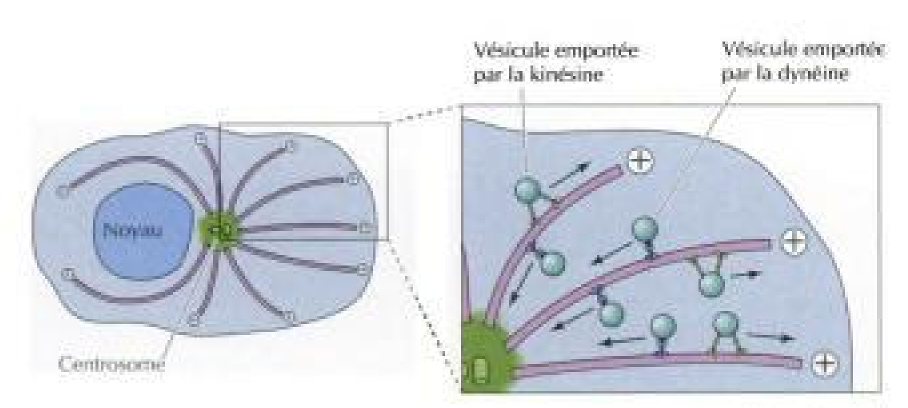
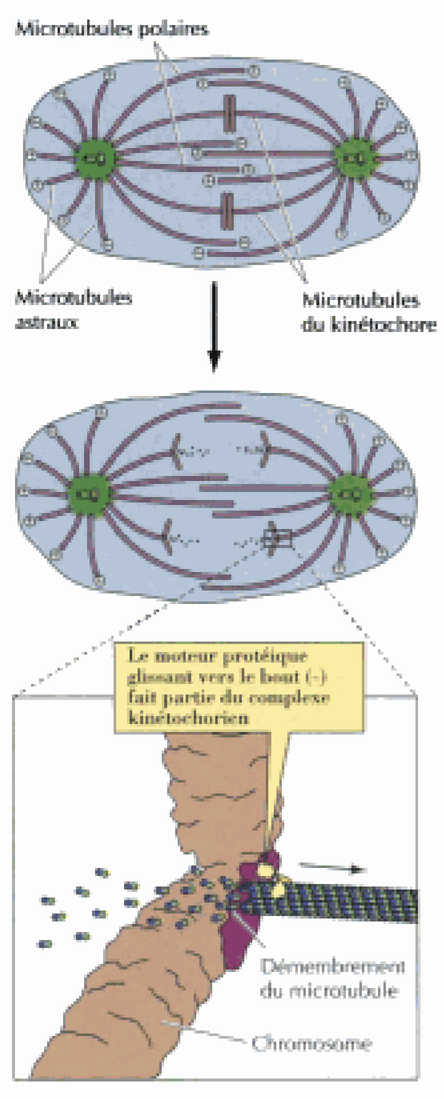


Figure 11.45
Transport de vésicules le long des microtubules. La kinésine pousse vésicules et organites vers le bout plus du microtubule, qui regarde la périphérie de la cellule. Par contre, la dynéine transporte sa charge vers le bout moins du microtubule, ancré au centre de la cellule.

Figure 11.47
Déplacement d'un chromosome pendant l'anaphase A. Les chromosomes glissent vers les pôles du fuseau le long des microtubules kinétochoriens ; ce mouvement serait entraîné (au moins en partie) par des moteurs moléculaires associés au kinétochore et grimpant vers le bout moins du microtubule. L'action de ces moteurs est couplée au démembrement et au raccourcissement des microtubules du kinétochore.



L'anaphase A consiste dans le mouvement des chromosomes vers les pôles du fuseau, le long des microtubules kinétochoriens, qui se raccourcissent à mesure que les chromosomes se déplacent (figure 11.47). On pense que ce type de glissement chromosomique est dû en partie à un moteur protéique fixé au kinétochore, moteur qui pousse le chromosome vers le bout moins des microtubules du fuseau, c'est-à-dire vers le centrosome. L'action de ce moteur est couplée au démembrement et au raccourcissement des microtubules kinétochoriens ; il semble que le déplacement du chromosome dépende de ces deux processus. Outre les moteurs kinétochoriens tirant vers le bout moins, le mouvement des chromosomes pendant l'anaphase serait entraîné par des moteurs moléculaires tirant vers le bout plus et par un démembrement de microtubules aux pôles du fuseau.

L'anaphase B consiste en ceci que les pôles du fuseau s'éloignent eux-mêmes l'un de l'autre (figure 11.48). Cet écartement s'accompagne d'un allongement des microtubules polaires et rappelle la séparation initiale des centrosomes répliqués au début de la mitose (voir figure 11.42). La séparation des pôles du fuseau est due à deux mécanismes, qui mettent en jeu les

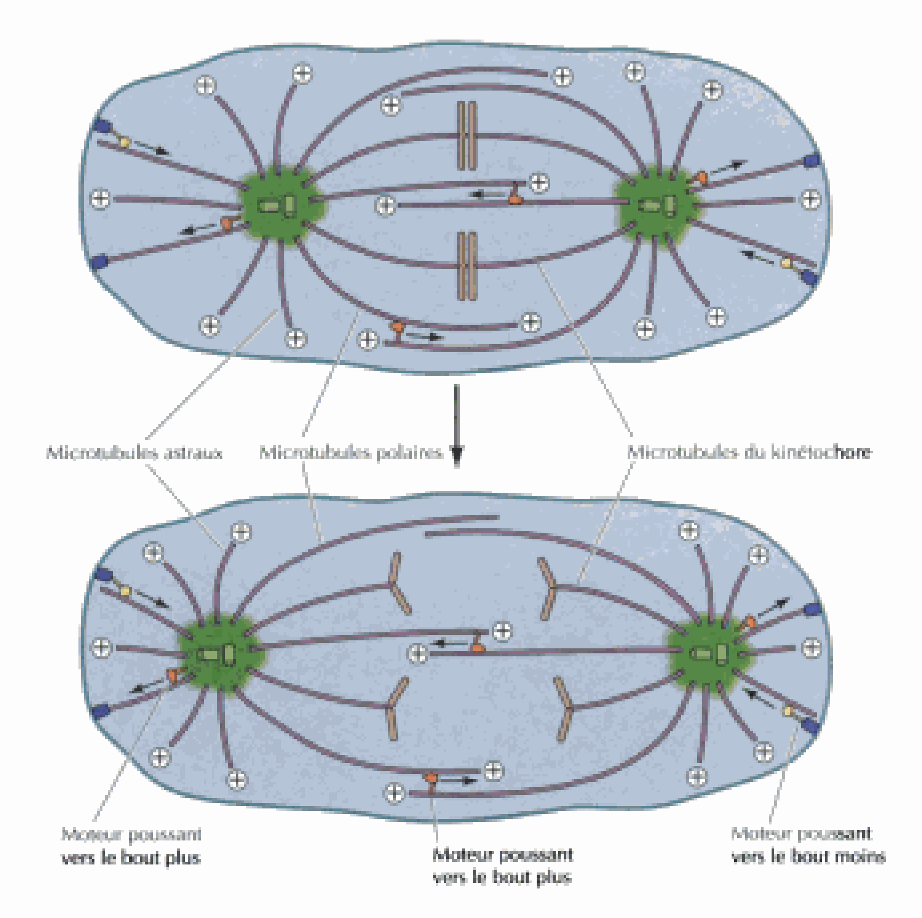


Figure 11.48
Séparation des pôles du fuseau pendant l'anaphase B. Deux forces écartent l'un de l'autre les pôles du fuseau. D'une part, les microtubules chevauchant glissent les uns sur les autres, en écartant les pôles, probablement sous l'action de moteurs moléculaires dirigés vers le bout plus des microtubules. D'autre part, les pôles sont entraînés par les microtubules astraux : la force en jeu est due soit à un moteur moléculaire poussant vers le bout moins du microtubule et ancré à une structure cytoplasmique telle que le cortex cellulaire, soit à un moteur ancré au pôle du fuseau et poussant vers le bout plus du microtubule.

microtubules polaires et les microtubules astraux. D'une part, les microtubules polaires imbriqués peuvent glisser les uns contre les autres, en écartant les pôles du fuseau ; ce déplacement serait dû à l'action de moteurs moléculaires glissant vers le bout plus, qui poussent un microtubule polaire donné vers le bout plus d'un microtubule chevauchant, donc en l'éloignant du pôle du fuseau opposé. D'autre part, les pôles du fuseau s'écarteraient sous l'action des microtubules astraux. Si on n'a pas prouvé l'existence de ce mécanisme, on peut l'expliquer par l'action d'une dynéine arrimée au cortex cellulaire ou à une autre structure cytoplasmique ; quand une telle dynéine arrimée se meut vers le bout moins d'un microtubule astral, c'est comme si elle écartait l'un de l'autre les pôles du fuseau, en les rapprochant du bord de la cellule ; sinon, on peut imaginer qu'un moteur moléculaire fixé au pôle du fuseau glisse vers le bout plus des microtubules astraux, ce qui reviendrait à pousser les pôles du fuseau vers les bords de la cellule.

On conçoit donc que la séparation des chromosomes et la formation de l'appareil mitotique dépendent de divers types de mouvements, dus à l'action conjuguée de plusieurs sortes de microtubules et des moteurs moléculaires qui leur sont associés. L'identification de ces protéines et la saisie des mécanismes qui soutiennent leur coopération constituent un défi pour les biologistes de demain.

Cils et flagelles

Les **cils** et les **flagelles** sont des prolongements de membrane plasmique enrobant des microtubules ; ils servent à exercer une force de déplacement sur tout une série de cellules eucaryotiques. Beaucoup de bactéries portent aussi des flagelles, mais ces flagelles n'ont rien de commun avec ceux des eucaryotes. Les flagelles bactériens (sur lesquels nous ne reviendrons plus) sont des filaments protéiques faisant saillie à la surface cellulaire, et non des

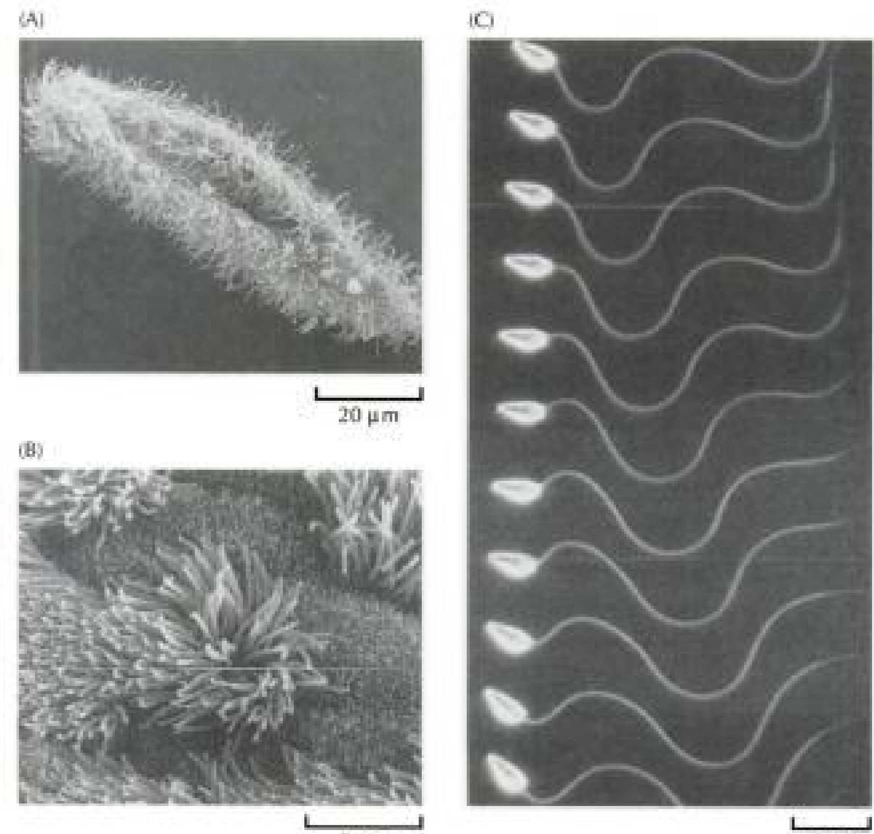


Figure 11.49
Exemples de cil et de flagelle.
(A) Micrographie électronique à balayage montrant la surface ciliée de *Paramecium*. (B) Micrographie électronique à balayage montrant la surface de cellules épithéliales bordant la trachée. (C) Clichés microcinématographiques (500 éclairs par seconde) montrant le mouvement ondulatoire du flagelle d'un spermatozoïde d'oursin. (A, Stanley Flager/Visuals Unlimited ; B, Fred E. Hossler/Visuals Unlimited ; C, C. J. Brokaw, CalTec)

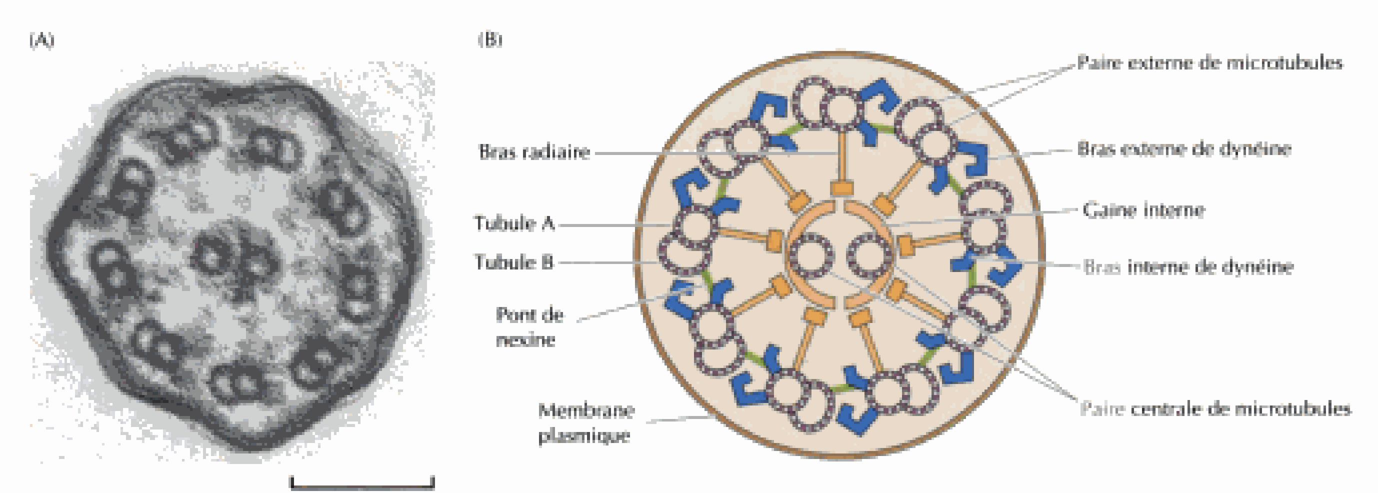
saillies de membrane plasmique soutenues par des microtubules.

Cils et flagelles d'eucaryotes sont des structures très semblables, d'un diamètre d'environ 0,25 µm (figure 11.49). Beaucoup de cellules sont couvertes d'une myriade de cils, de près de 10 µm de longueur. Les cils sont doués d'un mouvement de va-et-vient coordonné, qui pousse la cellule dans le fluide ou déplace le fluide à la surface de la cellule. Les cils de certains protozoaires (tel *Paramecium)* garantissent à la fois la motilité cellulaire et la canalisation, vers leur cavité buccale, des organismes dont ils s'alimentent. Chez les animaux, un rôle important des cils est de chasser les fluides et le mucus à la surface des couches de cellules épithéliales ; dans l'épithélium cilié bordant les voies respiratoires, le battement des cils débarrasse les bronchioles des poussières et du mucus. Les flagelles se distinguent des cils par leur longueur (ils atteignent parfois 200 µm) et par la nature ondulatoire de leurs battements. Les cellules ne portent en général qu'un ou deux flagelles, indispensables au mouvement des protozaires et des spermatozoïdes.

Le module de base du cil et du flagelle est l'**axonème**, composé de microtubules et de leurs protéines auxiliaires (figure 11.50). Les microtubules adoptent un arrangement de type " 9 + 2 ", dans lequel une paire centrale de microtubules est entourée de neuf paires de microtubules ; les deux microtubules soudés de chaque paire extérieure sont différents : l'un (le tubule A) est un microtubule complet fait de 13 protofilaments, l'autre (le tubule B) est incomplet, ses 10 ou 11 protofilaments sont soudés au tubule A. Les paires de tubules extérieurs sont unies à la paire centrale par des bras radiaux et arrimées les unes aux autres par une protéine appelée **nexine**. En outre, chaque tubule A porte deux bras de dynéine dont l'activité motrice entraîne le battement des cils et des flagelles.

Le bout moins des microtubules composant les cils et les flagelles est ancré dans le **corpuscule basal**, une structure rappellant le centriole et composée de neuf triades de microtubules (figure 11.51). On a mentionné les centrioles comme des constituants du centrosome, au sein duquel leur rôle est inconnu. On connaît cependant la fonction des corpuscules basaux, qui est d'organiser les microtubules de l'axonème de la façon suivante : chaque paire de microtubules extérieurs d'un axonème est le prolongement de deux des microtubules d'une triade du corpuscule basal. Ce dernier sert donc à amorcer la croissance des micotubules de l'axonème ainsi qu'à arrimer cils et flagelles à la surface de la cellule.

Figure 11.50
Structure de l'axonème des cils et des flagelles. (A) Micrographie électronique, contrastée à l'ordinateur, d'une coupe transversale d'axonème du flagelle d'un spermatozoïde de rat. (B) Coupe schématique d'un axonème. Les neuf paires externes comportent un microtubule complet (A) et un microtubule incomplet (B) contenant 10 ou 11 protofilaments. Ces paires externes sont unies entre elles par des ponts de nexine, et connectées à la paire centrale par des bras radiaires. Chaque paire externe de microtubules porte des bras interne et externe de dynéine. (A, K. G. Murti/ Visuals Unlimited).



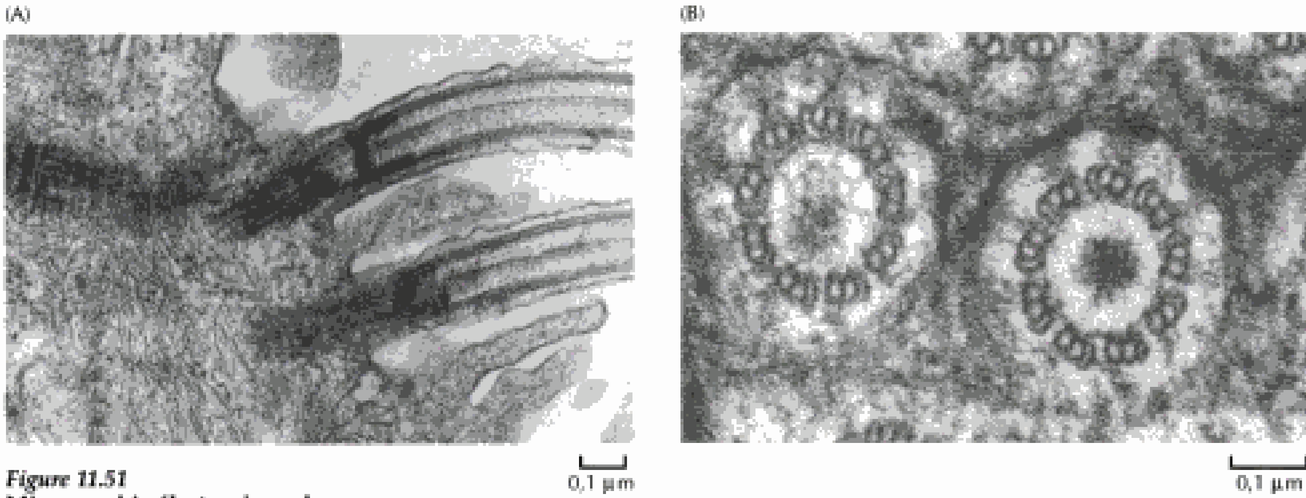
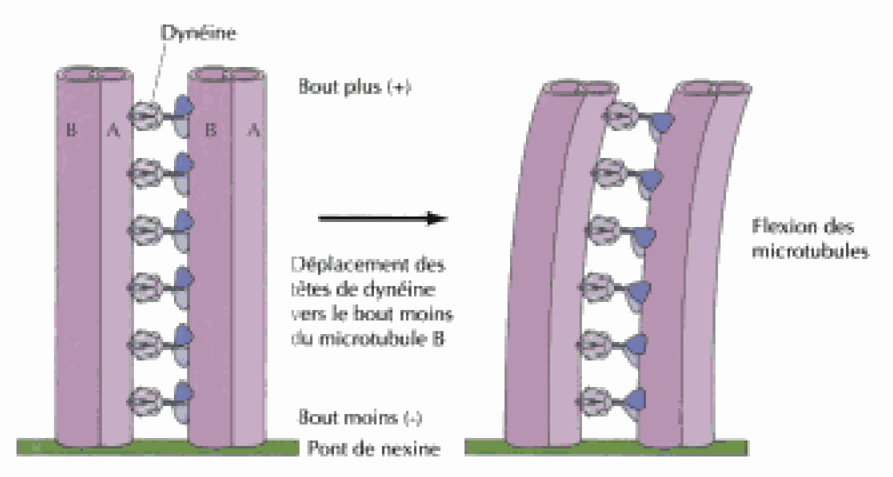


Figure 11.51
Micrographie électronique de corpuscules basaux. (A) Cils ancrés au corpuscule basal, vus en coupe longitudinale. (B) Coupe transversale de corpuscules basaux ; chacun possède neuf triades de microtubules. (A, Conly L. Reider/Biological Photo Service ; B, W. L. Dentler, Biological Photo Service).

Le mouvement des cils et des flagelles est dû au glissement des paires de microtubules extérieures les unes par rapport aux autres, sous la poussée de la dynéine axonémale (figure 11.52). Le pied de la dynéine s'appuie sur un tubule A pendant que sa tête s'attache au tubule B de la paire adjacente ; la poussée de la tête de dynéine vers le bout moins entraîne le tubule A d'une paire vers la base du tubule B adjacent. Comme les paires de microtubules axonémaux sont unis par des liens de nexine, le glissement d'une paire sur sa voisine tend à les courber toutes les deux, ce qui est l'essence même de la déformation des cils et des flagelles en battement. On conçoit cependant que l'activité des diverses molécules de dynéine qui composent l'axonème doive être bien orchestrée (un processus très mal connu) pour que les cils battent de façon coordonnée et que les flagelles présentent des mouvements ondulatoires.

Figure 11.52
Mouvements des microtubules dans les cils et les flagelles
Les bras de dynéine ont leur pied attaché aux tubules A ; leur tête motrice entre en interaction avec le tubule B d'une paire voisine. La poussée de la tête vers le bout moins du microtubule (vers la base du cil) tend à faire glisser le tubule A d'une paire vers la base du tubule B adjacent. Comme ces deux paires de microtubules sont reliées par des ponts de nexine, cette tension fléchit les microtubules.



Assemblage des filaments intermédiaires : Les filaments intermédiaires naissent de dimères de deux chaînes polypeptidiques torsadées l'une autour de l'autre en forme de câble. A leur tour, ces dimères s'associent en tétamères, qui se rassemblent en protofilaments ; ceux-ci se tordent les uns autour des autres pour former une structure en forme de câble.

desmosome, hémidesmosome

Arrangement des filaments intermédiaires dans le cytoplasme : Dans la plupart des cellules, les filaments intermédiaires forment un réseau allant de la périphérie du noyau à la membrane plasmique. Dans les cellules épithéliales, les filaments intermédiaires son amarrés à la membrane plasmique dans les zones de contact spécialisées (desmosomes et hémidesmosomes) ; les filaments intermédiaires jouent aussi un rôle particulier dans les cellules du muscle et dans les neurones.

Rôles des kératines et des neurofilaments : maladies de la peau et du système nerveux : On a prouvé l'importance des filaments intermédiaires comme soutien mécanique des cellules des tissus en introduisant des gènes de kératine mutés dans le génome de la souris. À de semblables mutations de gènes de kératine sont dues certaines maladies cutanées humaines ; on soupçonne aussi certaines anomalies de neurofilaments d'être responsables de lésions des neurones moteurs.

MICROTUBULES

microtubule, tubuline, instabilité dynamique, colchicine, colcémide, vincristine, vinblastine, taxol

Structure, assemblage et instabilité dynamique des microtubules : Les microtubules se forment par polymérisation réversible de la tubuline. Ils sont le siège d'une instabilité dynamique et subissent des cycles successifs d'assemblage et de démembrement, à la suite de l'hydrolyse du GTP porté par la tubuline qui vient de joindre un microtubule.

centre organisateur de microtubules, centrosome, centriole, matériau péricentriolaire

Centrosome et organisation de microtubules : Dans la plupart des cellules, les microtubules rayonnent du centre organisateur de microtubules, ou centrosome, situé au centre de la cellule. Dans les cellules animales, le centrosome comporte habituellement une paire de centrioles enrobée dans un matériau péricentriolaire. La croissance des microtubules démarre au niveau du matériau péricentriolaire, qui sert ensuite à maintenir leur bout moins.

fuseau mitotique, microtubule kinétochorien, microtubule polaire, microtubule astral,

Réorganisation des microtubules en cours de mitose : Au début de la mitose, les microtubules se réorganisent pour former le fuseau mitotique, indispensable à la séparation des chromosomes.

protéine associée aux microtubules (MAP)

Stabilisation des microtubules et polarité cellulaire : Une stabilisation sélective de microtubules par des protéines qui leur sont associées fixe la forme et la polarité de la cellule, notamment dans l'axone et les dendrites des neurones.

MOTEURS APPUYÉS SUR LES MICROTUBULES ET MOTILITÉ

kinésine, dynéine, dynéine axonémale, vidéo-microscopie, dynéine cytoplasmique

Identification des moteurs moléculaires s'appuyant sur les microtubules : Le déplacement le long des microtubules est dû à deux familles de moteurs protéiques, les kinésines et les dynéines. La kinésine et la plupart des protéines apparentées glissent vers le bout plus du microtubule, tandis que les dynéines glissent vers son bout moins.

Transport et mise en place des organites dans la cellule : La motilité le long des microtubules transporte les vésicules bordées de membrane ainsi que les organites à travers le cytoplasme, et met les organites en place dans le cytoplasme.

anaphase A, anaphase B

Séparation des chromosomes lors de la mitose : Lors de l'anaphase de la mitose, les chromatides sœurs se séparent pour gagner les pôles du fuseau mitotique. Cette séparation est due à plusieurs sortes de

mouvements accomplis par diverses classes de microtubules et de moteurs protéiques du fuseau.

Cils et flagelles : Les cils et les flagelles sont des prolongements de membrane plasmique soutenus par des microtubules. Leur mouvement est dû à un glissement de microtubules, sous la poussée de moteurs de la classe des dynéines.

cil, flagelle, axonème, nexine, corpuscule basal

QUESTIONNAIRE

1. La cytochalasine influencera-t-elle le mouvement de cellules qui poussent des pseudopodes en avant ou de cellules qui utilisent un flagelle pour se déplacer ?

2. Pourquoi la polarisation des filaments d'actine est-elle cruciale dans la contraction de la fibre musculaire ?

3. Doit-on s'attendre à ce que des mutations de gènes de kératines frappent les fibroblastes ?

4. Des deux événements de la division cellulaire que sont la répartition des chromosomes et la cytocinèse, quel est celui qui sera touché par la colchicine ?

5. Que deviendra le battement d'un cil dont on a enlevé la nexine ?

POUR EN SAVOIR PLUS

Références générales

Amos, L. A. and W. B. Amos. 1991. *Molecules of the Cytoskeleton*. New York: Guilford Press.

Bray, D. 1992. *Cell Movements*. New York: Garland Publishing.

Structure et assemblage des filaments d'actine

Bennett, V. and D. M. Gilligan. 1993. The spectrin-based membrane skeleton and micron-scale organization of the plasma membrane. *Ann. Rev. Cell Biol.* 9: 27–66. [R]

Bretscher, A. 1991. Microfilament structure and function in the cortical cytoskeleton. *Ann. Rev. Cell Biol.* 7: 337–374. [R]

Burridge, K., K. Fath, T. Kelly, G. Nuckolls, and C. Turner. 1988. Focal adhesions: Transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Ann. Rev. Cell Biol.* 4: 487–525. [R]

Campbell, K. P. 1995. Three muscular dystrophies: Loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage. *Cell* 80: 675–679. [R]

Cowin, P. 1994. Unraveling the cytoplasmic interactions of the cadherin superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 10759–10761. [R]

Holmes, K. C., D. Popp, W. Gebhard and W. Kabsch. 1990. Atomic model of the actin filament. *Nature* 347: 44–49. [P]

Jokusch, B. M., P. Bubeck, K. Giehl, M. Kroemker, J. Moschner, M. Rothkegel, M. Rüdiger, K. Schlüter, G. Stanke and J. Winkler. 1995. The molecular architecture of focal adhesions. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 11: 379–416. [R]

Kabsch, W., H. G. Mannherz, D. Suck, E. F. Pai and K. C. Holmes. 1990. Atomic structure of the actin: DNase I complex. *Nature* 347: 37–44. [P]

Luna, E. J. and A. L. Hitt. 1992. Cytoskeleton-plasma membrane interactions. *Science* 258: 955–964. [R]

Machesky, L. M. and T. D. Pollard. 1993. Profilin as a potential mediator of membrane-cytoskeleton communication. *Trends Cell Biol.* 3: 381–385. [R]

Matsudaira, P. 1991. Modular organization of actin crosslinking proteins. *Trends Biochem. Sci.* 16: 87–92. [R]

Pollard, T. D., S. Almo, S. Quirk, V. Vinson and E. E. Lattman. 1994. Structure of actin binding proteins: Insights about function at atomic resolution. *Ann. Rev. Cell Biol.* 10: 207–249. [R]

Pumplin, D. W. and R. J. Bloch. 1993. The membrane skeleton. *Trends Cell Biol.* 3: 113–117. [R]

Schafer, D. A. and J. A. Cooper. 1995. Control of actin assembly at filament ends. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 11: 497–518. [R]

Stossel, T. P. 1989. From signal to pseudopod: How cells control cytoplasmic actin assembly. *J. Biol. Chem.* 264: 18261–18264. [R]

Theriot, J. A. and T. J. Mitchison. 1993. The three faces of profilin. *Cell* 75: 835–838. [R]

Actine, myosine et motilité cellulaire

Condeelis, J. 1993. Life at the leading edge: The formation of cell protrusions. *Ann. Rev. Cell Biol.* 9: 411–444. [R]

Dominguez, R. *et al.* 1998. Crystal structure of a vertebrate smooth-muscle-myosin motor domain and its complex with the essential light chain : visualization of the pro-power stroke state. *Cell* **94** :559.[O]

Endow, S. A. and M. A. Titus. 1992. Genetic approaches to molecular motors. *Ann. Rev. Cell Biol.* 8: 29–66. [R]

Finer, J. T., R. M. Simmons and J. A. Spudich. 1994. Single myosin molecule mechanics: Piconewton forces and nanometre steps. *Nature* 368: 113–119. [P]

Huxley, A. F. and R. Niedergerke. 1954. Interference microscopy of living muscle fibres. *Nature* 173: 971–973. [P]

Huxley, H. E. 1969. The mechanism of muscle contraction. *Science* 164: 1356–1366. [R]

Huxley, H.E. and J. Hanson. 1954. Changes in the cross-striations of muscle contraction and their structural interpretation. *Nature* 173: 973–976. [P]

Lauffenburger, D. A. and A. F. Horwitz. 1996. Cell migration: A physically integrated molecular process. *Cell* 84: 359–369. [R]

Lee, J., A. Ishihara and K. Jacobson. 1993. How do cells move along surfaces? *Trends Cell Biol.* 3: 366–370. [R]

Machesky, L. M. et Way, M. 1998. Actin branches out. *Nature* **394** :126 (Formation de lamellipodes).

Mitchison, T. J. and L. P. Cramer. 1996. Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell* 84: 371–379. [R]

Mooseker, M. S. and R. E. Cheney. 1995. Unconventional myosins. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 11: 633–675. [R]

Rayment, I. and H. M. Holden. 1994. The three-dimensional structure of a molecular motor. *Trends Biochem. Sci.* 19: 129–134. [R]

Rayment, I., H. M. Holden, M. Whittaker, C. B. Yohn, M. Lorenz, K. C. Kolmes and R. A. Milligan. 1993. Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle contraction. *Science* 261: 58–65. [P]

Rayment, I., W. R. Rypniewski, K. Schmidt-Base, R. Smith, D. R. Tomchick, M. M. Benning, D. A. Winkelmann, G. Wesenberg and H. M. Holden. 1993. Three-dimensional structure of myosin

subfragment-1: A molecular motor. *Science* 261: 50–58. [P]

Spudich, J. A. 1994. How molecular motors work. *Nature* 372: 515–518. [R]

Stossel, T. P. 1993. On the crawling of animal cells. *Science* 260: 1086–1094. [R]

Tan, J. L., S. Ravid and J. A. Spudich. 1992. Control of nonmuscle myosins by phosphorylation. *Ann. Rev. Biochem.* 61: 721–759. [R]

Trinick, J. 1994. Titin and nebulin: Protein rulers in muscle? *Trends Biochem. Sci.* 19: 405–409. [R]

Vale, R. D. 1994. Getting a grip on myosin. *Cell* 78: 733–737. [R]

Zot, A. S. and J. D. Potter. 1987. Structural aspects of troponin-tropomyosin regulation of skeletal muscle contraction. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 16: 535–559. [R]

Filaments intermédiaires

Bonifas, J. M., A. L. Rothman and E. H. Epstein Jr. 1991. Epidermolysis bullosa simplex: Evidence in two families for keratin gene abnormalities. *Science* 254: 1202–1205. [P]

Brown, R. H., Jr. 1995. Amyotrophic lateral sclerosis: Recent insights from genetics and transgenic mice. *Cell* 80: 687–692. [R]

Coulombe, P. A., M. E. Hutton, A. Letai, A. Hebert, A. S. Paller and E. Fuchs. 1991. Point mutations in human keratin 14 genes of epidermolysis bullosa simplex patients: Genetic and functional analyses. *Cell* 66: 1301–1311. [P]

Fuchs, E. 1995. Keratins and the skin. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 11: 123–153. [R]

Fuchs, E., Y. Chan, A. S. Paller and Q.-C. Yu. 1994. Cracks in the foundation: Keratin filaments and genetic disease. *Trends Cell Biol.* 4: 321–326. [R]

Schwarz, M. A., K. Owaribe, J. Kartenbeck and W. W. Franke. 1990. Desmosomes and hemidesmosomes: Constitutive molecular components. *Ann. Rev. Cell Biol.* 6: 461–491. [R]

Skalli, O., Y.-H. Chou and R. D. Goldman. 1992. Intermediate filaments: Not so tough after all. *Trends Cell Biol.* 2: 308–312. [R]

Steinert, P. M. and D. R. Roop. 1988. Molecular and cellular biology of intermediate filaments. *Ann. Rev. Biochem.* 57: 593–625. [R]

Vassar, R., P. A. Coulombe, L. Degenstein, K. Albers and E. Fuchs. 1991. Mutant keratin expression in transgenic mice causes marked abnormalities resembling a human genetic skin disease. *Cell* 64: 365–380. [P]

Microtubules

Brinkley, R. R. 1985. Microtubule organizing centers. *Ann. Rev. Cell Biol.* 1: 145–172. [R]

Caceres, A. and K. S. Kosik. 1990. Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotides in cerebellar neurons. *Nature* 343: 461–463 [P].

Gelfand, V. I. and A. D. Bershadsky. 1991. Microtubule dynamics: Mechanism, regulation, and function. *Ann. Rev. Cell Biol.* 7: 93–116. [R]

Hyman, A. A. and E. Karsenti. 1996. Morphogenetic properties of microtubules and mitotic spindle assembly. *Cell* 84: 401–410 [R].

Kalt, A. and M. Schliwa. 1993. Molecular components of the centrosome. *Trends Cell Biol.* 3: 118–128. [R]

Kellogg, D. R., M. Moritz and B. M. Alberts. 1994. The centrosome and cellular organization. *Ann. Rev. Biochem.* 63: 639–674. [R]

Kirschner, M. and T. Mitchison. 1986. Beyond self-assembly: From microtubules to morphogenesis. *Cell* 45: 329–342. [R]

Lee, G. 1993. Non-motor microtubule-associated proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5: 88–94. [R]

Mitchison, T. J. 1992. Compare and contrast actin filaments and microtubules. *Mol. Biol. Cell* 3: 1309–1315. [R]

Mitchison, T. and M. Kirschner. 1984. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 312: 237–242. [P]

Mitchison, T. and M. Kirschner. 1984. Microtubule assembly nucleated by isolated centrosomes. *Nature* 312: 232–237. [P]

Oakley, B. R., C. E. Oakley, Y. Yoon and M. K. Jung. 1990. γ-Tubulin is a component of the spindle pole body that is essential for microtubule function in *Aspergillus nidulans*. *Cell* 61: 1289–1301. [P]

Osborn, M. and K. Weber. 1976. Cytoplasmic microtubules in tissue culture cells appear to grow from an organizing structure towards the plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 867–871. [P]

Zheng, Y., M. L. Wong, B. Alberts and T. Mitchison. 1995. Nucleation of microtubule assembly by a γ-tubulin-containing ring complex. *Nature* 378: 578–583. [P]

Moteurs et déplacements sur les microtubules

Asai, D. J. and C. J. Brokaw. 1993. Dynein heavy chain isoforms and axonemal motility. *Trends Cell Biol.* 3: 398–403. [R]

Block, S. M. 1995. Nanometres and piconewtons: The macromolecular mechanics of kinesin. *Trends Cell Biol.* 5: 169–175. [R]

Brady, S. T. 1985. A novel brain ATPase with properties expected for the fast axonal motor. *Nature* 317: 73–75. [P]

Brady, S. T. 1995. A kinesin medley: Biochemical and functional heterogeneity. *Trends Cell Biol.* 5: 159–164. [R]

Brady, S. T., R. J. Lasek and R. D. Allen. 1982. Fast axonal transport in extruded axoplasm from squid giant axon. *Science* 218: 1129–1131. [P]

Desai, A. and T. J. Mitchison. 1995. A new role for motor proteins as couplers to depolymerizing microtubules. *J. Cell Biol.* 128: 1–4. [R]

Endow, S. A. and M. A. Titus. 1992. Genetic approaches to molecular motors. *Ann. Rev. Cell Biol.* 8: 29–66. [R]

Fuller, M. T. and P. G. Wilson. 1992. Force and counterforce in the mitotic spindle. *Cell* 71: 547–550. [R]

Gibbons, I. R. 1981. Cilia and flagella of eukaryotes. *J. Cell Biol.* 91: 107s–124s. [R]

Gibbons, I. R. and A. Rowe. 1965. Dynein: A protein with adenosine triphosphatase activity from cilia. *Science* 149: 424–426. [P]

Haimo, L. T. 1995. Regulation of kinesin-directed movements. *Trends Cell Biol.* 5: 165–168. [R]

Holzbaur, E. L. F. and R. B. Vallee. 1994. Dyneins: Molecular structure and cellular function. *Ann. Rev. Cell Biol.* 10: 339–372. [R]

Kull, F. J., E. P. Sablin, R. Lau, R. J. Fletterick and R. D. Vale. 1996. Crystal structure of the kinesin motor domain reveals a structural similarity to myosin. *Nature* 380: 550–555. [P]

Lasek, R. J. and S. T. Brady. 1985. Attachment of transported vesicles to microtubules in axoplasm is facilitated by AMP-PNP. *Nature* 316: 645–647. [P]

Porter, M. E. and K. A. Johnson. 1991. Dynein structure and function. *Ann. Rev. Cell Biol.* 5: 119–151. [R]

Salmon, E. D. 1995. VE-DIC light microscopy and the discovery of kinesin. *Trends Cell Biol.* 5: 154–157. [R]

Saunders, W. S. 1993. Mitotic spindle pole separation. *Trends Cell Biol.* 3: 432–437. [R]

Vale, R. D. 1987. Intracellular transport using microtubule-based motors. *Ann. Rev. Cell Biol.* 3: 347–378. [R]

Vale, R. D. 1992. Microtubule motors: Many new models off the assembly line. *Trends Biochem. Sci.* 17: 300–304. [R]

Vale, R. D., T. S. Reese and M. P. Sheetz. 1985. Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell* 42: 39–50. [P]

Vallee, R. B. and M. P. Sheetz. 1996. Targeting of motor proteins. *Science* 271: 1539–1544. [R]

Vallee, R. B. and H. S. Shpetner. 1990. Motor proteins of cytoplasmic microtubules. *Ann. Rev. Biochem.* 59: 909–932. [R]

Walker, R. A. and M. P. Sheetz. 1993. Cytoplasmic microtubule-associated motors. *Ann. Rev. Biochem.* 62: 429–451. [R]

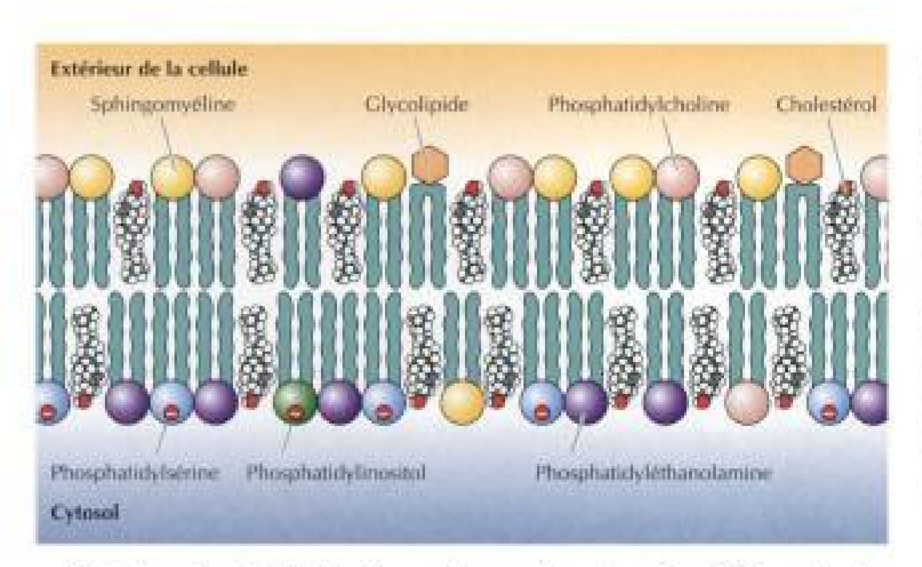


Figure 12.2
Composants lipidiques de la membrane plasmique. Le feuillet externe comporte surtout de la phosphatidylcholine, de la sphingomyéline et des glycolipides, tandis que le feuillet interne contient de la phosphatidyléthanolamine, de la phosphatidylsérine et du phosphatidylinositol. Le cholestérol est présent dans les deux feuillets. On a indiqué la charge nette négative des groupes de tête de la phosphatidylsérine et du phosphatidylinositol. On trouvera la structure des phospholipides, des glycolipides et du cholestérol aux figures 2.7, 2.8 et 2.9.

Outre les phospholipides, la membrane plasmique des cellules animales contient aussi des **glycolipides** et du **cholestérol**. On ne trouve de glycolipides que dans le feuillet externe de la membrane plasmique, leur groupe glucidique étant accessible à la surface de la cellule. Ce sont des composants membranaires assez mineurs puisqu'ils ne représentent qu'environ 2 % des lipides de la plupart des membranes plasmiques, mais le cholestérol, un constituant membranaire prépondérant des cellules animales, y atteint, en moles, à peu près la même valeur que les phospholipides.

Le fonctionnement d'une membrane dépend de deux traits caractéristiques de la bicouche phospholipidique. D'une part, la structure des phospholipides garantit le rôle fondamental d'une membrane en tant que barrière entre deux compartiments aqueux ; en effet, comme le cœur de la bicouche phospholipidique est occupé par les chaînes acyles grasses hydrophobes, la membrane est imperméable aux molécules hydrosolubles, y compris les ions et la plupart des biomolécules. D'autre part, les bicouches de phospholipides naturels sont des fluides visqueux et non des solides. Les acides gras de la majorité des phospholipides naturels possèdent au moins une liaison double, qui introduit un coude dans leurs chaînes aliphatiques, les empêchant de s'empiler les unes contre les autres ; aussi les longues chaînes aliphatiques d'acides gras flottent-elles librement au sein de la membrane, de sorte que celle-ci est molle et élastique. En outre, tant les phospholipides que les protéines ont la liberté de diffuser latéralement dans le plan de la membrane, une propriété cruciale pour nombre de fonctions membranaires.

Grâce à sa structure cyclique rigide, le cholestérol joue un rôle à part dans la structure membranaire. Il est incapable à lui seul de former une membrane, mais il ira s'insérer dans une bicouche de phospholipides, avec son groupe hydroxyle polaire au voisinage des groupes polaires des phospholipides (voir figure 12.2). Selon la température, le cholestérol influence de diverses façons la fluidité d'une membrane. Aux températures élevées, le cholestérol contrecarre le mouvement des chaînes acyles grasses des phospholipides, rendant la zone externe de la membrane moins fluide et la perméabilité aux petites molécules plus réduite. Aux basses températures, l'effet du cholestérol est inverse : en contrecarrant l'interaction des chaînes acyles grasses, le cholestérol empêche les membranes de se congeler et leur assure une certaine fluidité. Bien que le cholestérol soit absent chez les bactéries, il est un composant essentiel des membranes plasmiques des cellules animales. Les cellules végétales sont également dépourvues de cholestérol, mais elles contiennent des composés apparentés (stérols) qui jouent le même rôle que le cholestérol.

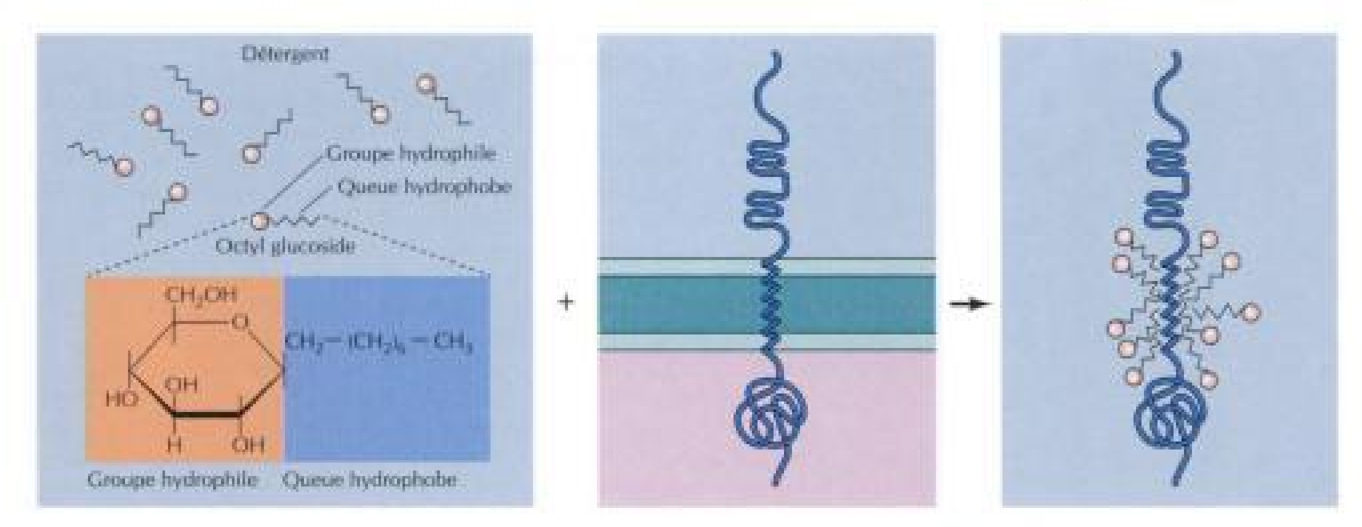


Figure 12.4
Mise en solution de protéines membranaires intrinsèques par des détergents. Les détergents (par exemple, l'octyl glucoside) sont des substances amphipathiques, formées d'une tête à groupe hydrophile et d'une queue hydrophobe. Leur queue hydrophobe s'attache aux régions hydrophobes des protéines membranaires intrinsèques, en formant des complexes détergent-protéine solubles dans les solutions aqueuses.

arrimées aux membranes *via* des interactions entre protéines, qui font souvent intervenir des liaisons ioniques, détruites par les pH extrêmes ou les sels concentrés.

Contrairement aux protéines membranaires adventices, on ne peut détacher les protéines membranaires intrinsèques de la membrane que par les traitements qui dispersent la bicouche phospholipidique ; en effet, certains domaines de ces protéines étant noyés dans la bicouche, on doit utiliser des substances qui détruisent les interactions hydrophobes. Les substances habituellement employées pour dissoudre les protéines membranaires intrinsèques sont des détergents, c'est-à-dire de petites molécules amphipathiques, possédant à la fois un groupe hydrophobe et un groupe hydrophile (figure 12.4). La portion hydrophobe d'un détergent prend la place des lipides membranaires fixés aux domaines hydrophobes des protéines membranaires intrinsèques ; comme l'autre extrémité des molécules de détergent est hydrophile, les complexes détergent-protéine sont solubles dans les solutions salines.

Beaucoup de protéines intrinsèques sont des **protéines transmembranaires**, qui occupent toute l'épaisseur de la membrane et émergent à ses deux faces. On les reconnaît sur les micrographies électroniques de membrane plasmique préparée par cryofracture (voir figure 1.33) ; dans ces préparations, on a fendu la membrane et on a séparé ses feuillets ; les protéines transmembranaires sont alors visibles sous forme de particules plantées à la face interne des feuillets membranaires (figure 12.5).

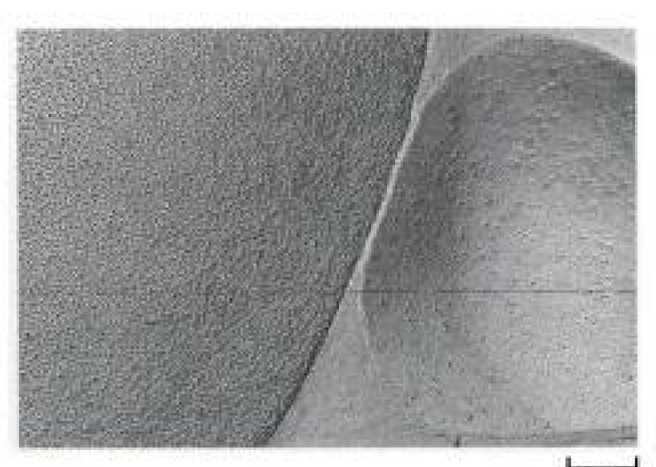


Figure 12.5
Micrographie d'une membrane de globule rouge humain après cryofracture. Les particules couvrant la membrane sont des protéines transmembranaires (Harold H. Edwards/Visuals Unlimited).

La portion transmembranaire d'une protéine transmembranaire est d'ordinaire constituée d'une série d'hélices α formées de 20 à 25 résidus d'acide aminé hydrophobes qui sont insérés dans la membrane du réticulum endoplasmique lors de la synthèse de la chaîne polypeptidique (voir figures 9.10, 9.11 et 9.12) ; rassemblées dans des vésicules bordées d'une membrane, ces protéines sont ensuite transbordées du réticulum endoplasmique à l'appareil de Golgi puis de là insérées dans la membrane plasmique. Dans ces deux compartiments, les chaînes polypeptidiques reçoivent des groupes glucidiques, de sorte que la plupart des protéines transmembranaires de la membrane plasmique sont des glycoprotéines, portant des oligosaccharides sur leur face exposée au milieu extracellulaire.

L'étude des globules rouges a permis de se faire une idée précise de la nature des protéines, tant adventices que intrinsèques, qui font partie de la membrane plasmique. La membrane des érythrocytes humains contient une douzaine de protéines principales, identifiées d'abord sur les profils d'électrophorèse en gel des préparations de membrane ; on a montré que la plupart sont des protéines membranaire adventices appartenant au cytosquelette cortical, sous-jacent à la membrane plasmique et responsable de la forme de la cellule (voir chapitre 11). Ainsi, la protéine membranaire périphérique prépondérante de l'érythrocyte est la spectrine, qui est le principal constituant du cytosquelette érythrocytaire ; parmi les autres protéines membranaires adventices du globule rouge, citons l'actine, l'ankyrine et la protéine de la bande 4.1. L'ankyrine est le principal lien entre le cytosquelette et la membrane plasmique, car elle s'attache à la fois à la spectrine et à une protéine membranaire intrinsèque appelée protéine de la bande 3 (voir figure 11.11). Le cytosquelette serait aussi relié à la membrane plasmique par la protéine de la bande 4.1, qui se fixe aux points de contact de l'actine avec la spectrine ainsi qu'à la protéine de la bande 3 et à la glycophorine (les deux principales protéines membranaires intrinsèques de l'érythrocyte).

Les biologistes moléculaires ont élucidé la structure des protéines membranaires intrinsèques en étudiant deux protéines de ce type appartenant à l'érythrocyte, à savoir la glycophorine et la protéine de la bande 3 (figure 12.6). La glycophorine est une petite glycoprotéine de 131 résidus d'acide aminé, d'un poids moléculaire d'environ 30 000, moitié protéique et moitié glucidique. La glycophorine traverse la membrane *via* une unique hélice α transmembranaire de 23 résidus d'acide aminé, glycosylée à son extrémité aminée faisant saillie à la surface de la cellule. Bien que la glycophorine fût la première caractérisée parmi les protéines transmembranaires, son rôle précis nous échappe encore. Par contre, on connaît celui de la principale protéine transmembranaire de l'érythrocyte ; baptisée protéine de la bande 3, elle est le transporteur d'anions responsable du passage des ions hydrogé-

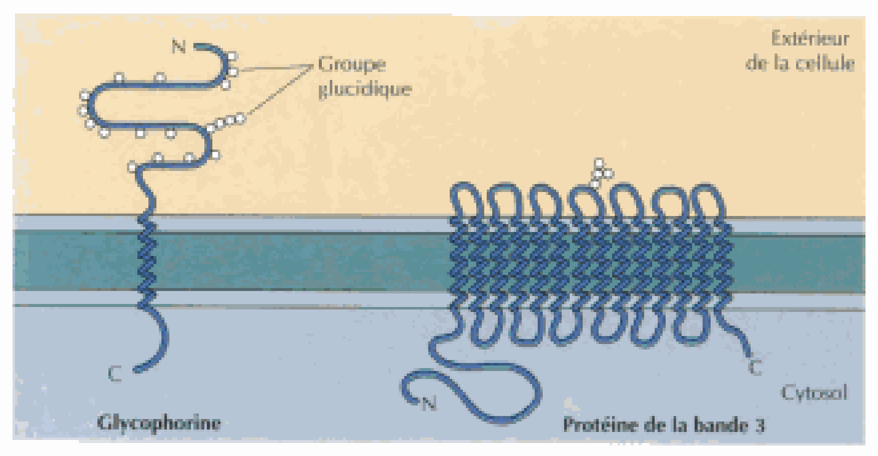


Figure 12.6
Protéines membranaires intrinsèques de l'érythrocyte. La glycophorine (131 résidus d'acide aminé) ne comporte qu'une seule hélice α transmembranaire. Elle est richement glycosylée, par des oligosaccharides fixés en 16 sites de la portion extracellulaire de la chaîne polypeptidique. La protéine de la bande 3 (929 résidus d'acide aminé) comporte de nombreuses hélices α transmembranaires et sa chaîne traverse probablement 14 fois la membrane.

nocarbonate ($^-HCO_3$) et chlorure (^-Cl) à travers la membrane de l'érythrocyte. La protéine de la bande 3 est une chaîne polypeptidique de 929 résidus d'acide aminé ; elle consisterait en 14 régions α-hélicoïdales transmembranaires ; au sein de la membrane, ses dimères forment des structures globulaires ménageant un tunnel interne qui permet aux ions de franchir la bicouche phospholipidique.

À cause de leur nature amphipathique, il fut très malaisé de cristalliser les protéines transmembranaires, une étape préalable à l'élucidation de leur structure atomique à partir des diffractogrammes X ; aussi ne connait-on à présent la structure que de quelques protéines transmembranaires. La première dont on obtint des diffractogrammes X est le centre réactionnel photosynthétique de la bactérie *Rhodopseudomonas viridis*, dont la structure fut publiée en 1985 (figure 12.7). Ce centre réactionnel comporte trois protéines transmembranaires, désignées L, M et H (soit légère, moyenne et lourde), selon leur taille apparente sur les électropohorèses en gel. Chacun des protomères L et M possède cinq hélices α transmembranaires ; le protomère H n'en possède qu'une seule et le reste de sa chaîne polypeptidique émerge à la face cytoplasmique de la membrane. Le quatrième élément du centre réactionnel est un cytochrome, une protéine membranaire adventice attachée au complexe par des interactions de protéine à protéine.

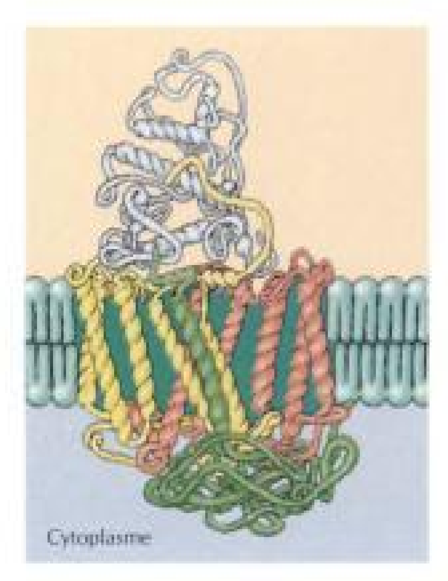


Figure 12.7
Centre de la réaction photosynthétique chez une bactérie. Le centre réactionnel comporte trois protéines transmembranaires, appelée L (en rouge), M (en jaune) et H (en vert). Les protomères L et M possèdent chacun cinq hélices α transmembranaires, le protomère H une seule. Le quatrième élément du centre réactionnel est un cytochrome (en blanc), qui est une protéine membranaire adventice.

La portion transmembranaire d'une protéine intrinsèque n'est cependant pas toujours une hélice α ; c'est notamment le cas des **porines**, une classe de protéines formant un tunnel dans la membrane externe de certaines bactéries. De nombreuses espèces bactériennes, dont *E. coli*, possèdent un système bimembranaire, où la membrane plasmique (la membrane interne) est entourée d'une paroi, et une membrane externe propre (figure 12.8). Contrairement à la membrane plasmique, cette membrane externe est tout à fait perméable aux ions et aux petites molécules polaires (chez *E. coli*, d'un poids moléculaire allant jusqu'à 600) ; cette perméabilité est due aux porines, qui ménagent des pores aqueux à travers la bicouche lipidique. Comme on l'a montré au chapitre 10, il existe des protéines apparentées aux porines bactériennes dans la membrane externe de la mitochondrie et du chloroplaste.

L'étude de la structure des porines a montré que ces molécules sont dépourvues de régions α-hélicoïdales hydrophobes ; leur région transmembranaire est au contraire reployée en un tonneau β, formé de 16 feuillets β arrangés en une structure annulaire ménageant un pore aqueux (figure 12.9). Les chaînes latérales des résidus d'acide aminé polaires bordent le pore, tandis que les chaînes latérales des résidus d'acide aminé hydrophobes sont au contact du cœur de la bicouche. Les protomères de

Figure 12.8
Membranes d'une bactérie. La membrane plasmique de certaines bactéries est entourée par une paroi et par une membrane extérieure distincte. Cette membrane extérieure comporte des porines, qui ménagent en leur sein un tunnel aqueux perméable aux ions et aux petites molécules.

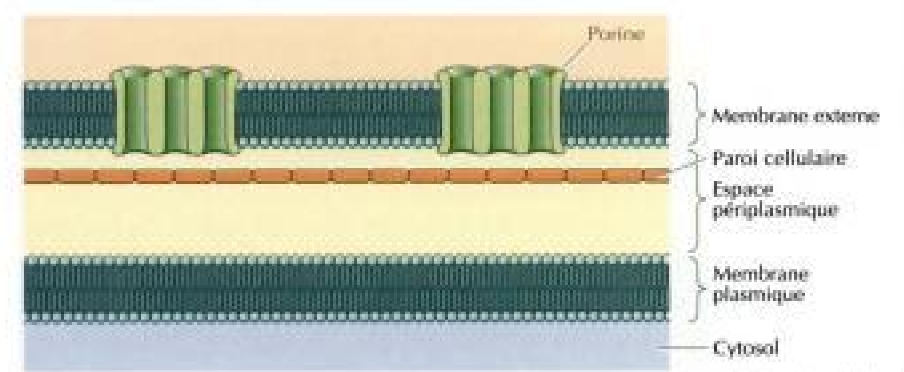
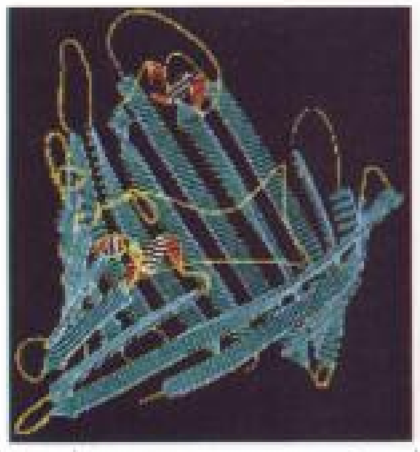


Figure 12.9
Structure du protomère de porine. Chaque protomère forme un tonneau β fait de 16 brins β antiparallèles (flèches). L'extrémité supérieure de la molécule plonge dans le milieu extracellulaire (D'après H. Nikaido, 1994, *J. Biol. Chem.* **269** :3905).



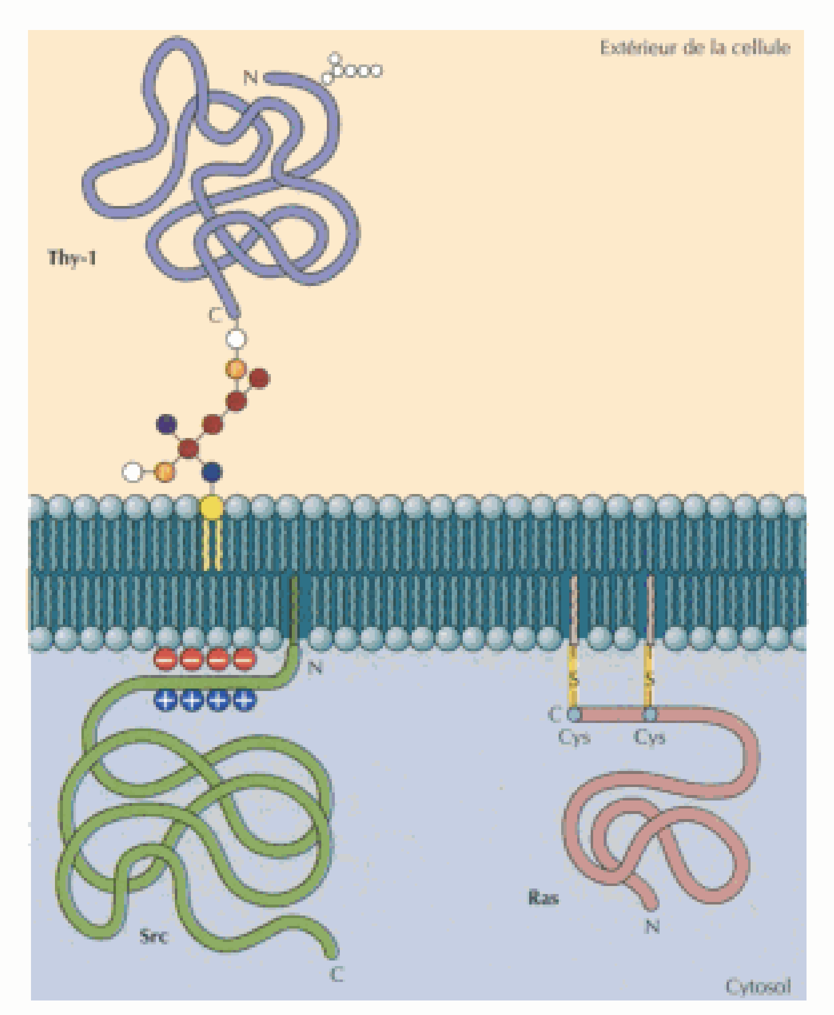


Figure 12.10
Quelques protéines ancrées dans la membrane plasmique par attachement à un lipide ou à un glycolipide. Certaines protéines, comme la protéine Thy-1 du lymphocyte, tiennent au feuillet externe de la membrane plasmique par une ancre GPI greffée à leur bout carboxyle au moment de leur passage dans le réticulum endoplasmique ; ces protéines sont glycosylées et font saillie à la surface de la cellule. D'autres protéines sont arrimées au feuillet interne de la membrane plasmique, à la suite de leur traduction sur un ribosome libre. La protéine Ras, ici dessinée, est maintenue par un groupe prényle greffé à la chaîne latérale d'une cystéine C-terminale et par un groupe palmityle greffé à une cystéine siégeant cinq résidus en amont. La protéine Src est retenue par un groupe myristyle greffé à son N terminal. Un domaine à charge positive de Src intervient aussi dans son attachement à la membrane, peut-être en s'accolant au groupe de tête négatif des phosphatidylsérines. On trouvera la structure de ces groupes lipidiques et glycolipidiques dans les figures 7.29 à 7.32.

porine s'assemblent en trimères stables, possédant chacun trois tunnels ouverts par lesquels les molécules polaires diffusent à travers la membrane externe.

Contrairement aux protéines transmembranaires, certaines protéines (beaucoup se comportent comme des protéines membranaires intrinsèques) sont arrimées à la membrane plasmique par les liaisons covalentes entre leur chaîne polypeptidique et un lipide ou un glycolipide (figure 12.10). Des membres d'une classe de ce type de protéines s'insèrent dans le feuillet externe de la membrane *via* une **ancre à glycosylphosphatidylinositol (GPI)**. Ce groupe est greffé à certaines protéines passées au réticulum endoplasmique et insérées dans sa membrane par une région C-terminale transmembranaire (voir figure 9.15) ; cette région transmembranaire est amputée au moment où l'ancre GPI est greffée, de sorte que ces protéines ne sont plus retenues dans la membrane que par un groupe glycolipidique. Comme la chaîne polypeptidique des protéines à ancre GPI est transférée dans le réticulum endoplasmique, elle est glycosylée et déborde à la surface de la cellule après son insertion dans la membrane plasmique.

D'autres protéines sont arrimées au feuillet interne de la membrane plasmique au moyen de lipides qui leur sont attachés par covalence. Au lieu de suivre la voie sécrétoire, ces protéines sont synthétisées sur des ribosomes libres dans le cytosol puis modifiées par addition de lipides, notamment d'acide myristique (un acide gras à 14 carbones) à l'acide aminé N-terminal de la chaîne polypeptidique, d'acide palmitique (16 carbones) à la chaîne latérale de certains résidus de cystéine ou d'un groupe prényle (15 ou 20 carbones) à la chaîne latérale de certains résidus cystéinyle C-terminaux (voir figures 7.29, 7.30 et 7.31). Dans certains cas, ces protéines (beaucoup se comportent comme des protéines membranaires adventices) sont véhiculées à la membrane plasmique par des régions de la chaîne polypeptidique chargées positivement ainsi que par les lipides qui lui ont été greffés ; ces domaines protéiques chargés positivement entreraient en interactions avec les groupes polaires négatifs de phosphatidylsérine des lipides occupant la face cytosolique de la membrane plasmique. Retenons que maintes protéines ancrées au feuillet interne de la membrane plasmique (telles les protéines Src et Ras illustrées dans la figure 12.10) jouent un rôle important dans la transmission, aux cibles intracellulaires, de signaux issus de récepteurs cellulaires superficiels (voir chapitre suivant).

Mobilité des protéines membranaires

Les protéines et les phospholipides membranaires ne passent pas à vitesse appréciable d'un feuillet à l'autre d'une membrane, mais, parce qu'ils flottent dans une bicouche lipidique fluide, peuvent diffuser latéralement sur toute l'étendue de la membrane. Ce déplacement fut démontré directement pour la première fois par Larry Frye et Michael Edidin en 1970, au cours d'une expérience qui soutenait le modèle de la mosaïque fluide. Ces cher-

cheurs fusionnèrent, en boîte de culture, des cellules humaines à des cellules de souris et obtinrent des hybrides homme-souris (figure 12.11). Ils suivirent alors la répartition des protéines membranaires de ces cellules hybrides à l'aide d'anticorps reconnaissant spécifiquement l'origine humaine ou murine de ces protéines ; ils avaient marqué ces anticorps par des substances fluorescentes permettant de distinguer au microscope à fluorescence les protéines humaines des protéines de souris. Tout de suite après la fusion, les protéines étaient situées chacune dans une moitié de la cellule hybride, mais après une certaine période d'incubation à 37 °C, les protéines humaines et celles de souris s'étaient complètement mélangées sur toute le surface de la cellule ; on prouvait ainsi qu'elles se déplaçaient librement dans toute l'étendue de la membrane plasmique.

Néanmoins, les protéines ne peuvent pas toutes diffuser librement dans la membrane ; la mobilité de certaines protéines membranaires est contrecarrée par leur association avec le cytosquelette. Par exemple, la protéine de la bande 3 est en partie immobilisée dans la membrane du globule rouge, à cause de son attachement à l'ankyrine et à la spectrine. Dans d'autres cas, la mobilité de telle protéine membranaire est limitée par association avec telle autre protéine membranaire, avec une protéine de la surface d'une cellule voisine ou avec la matrice extracellulaire.

Contrairement à l'érythrocyte, la cellule épithéliale est polarisée quand elle fait partie d'un tissu, où ses différentes parties remplissent un fonction particulière ; aussi la membrane plasmique de beaucoup de cellules épithéliales est-elle partagée en **domaine apical** et **domaine basolatéral**, qui se distinguent par leur composition en protéines et par leur fonction (figure 12.12). Ainsi en est-il des cellules épithéliales de l'intestin grêle servant à absorber les aliments parvenus dans le tube digestif ; la face apicale de ces cellules, qui regarde la lumière intestinale, est couverte de villosités et sert à absorber les nutriments ; la face basolatérale, tournée vers le tissu conjonctif sous-jacent et le lit vasculaire, est spécialisée dans le transfert au courant sanguin des aliments absorbés. Ces fonctions propres ne se maintiennent que si la

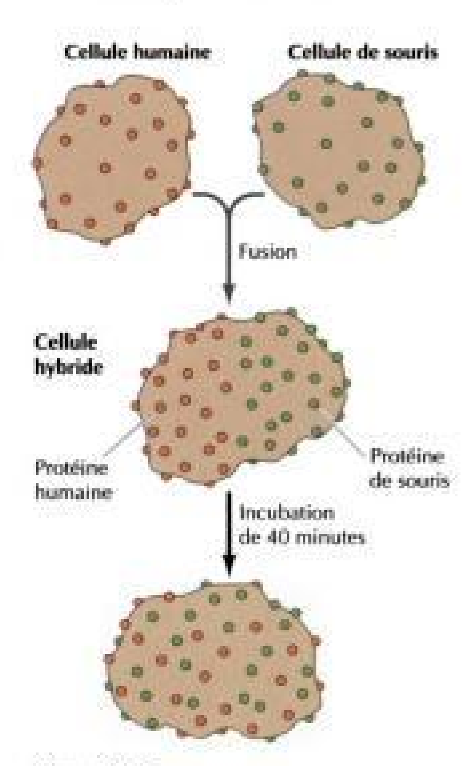


Figure 12.11
Mobilité des protéines membranaires. En fusionnant une cellule humaine à une cellule de souris on a obtenu une cellule hybride. On a ensuite étudié la distribution des protéines à sa surface grâce à des anticorps anti-humain et anti-souris marqués par des substances fluorescentes différentes (respectivement rouge et verte). Immédiatement après la fusion, les protéines humaines et celles de souris siègeaient chacune dans une moitié de la cellule hybride, mais après quelque 40 minutes d'incubation elles s'étaient mélangées pour occuper toute la surface de la cellule.

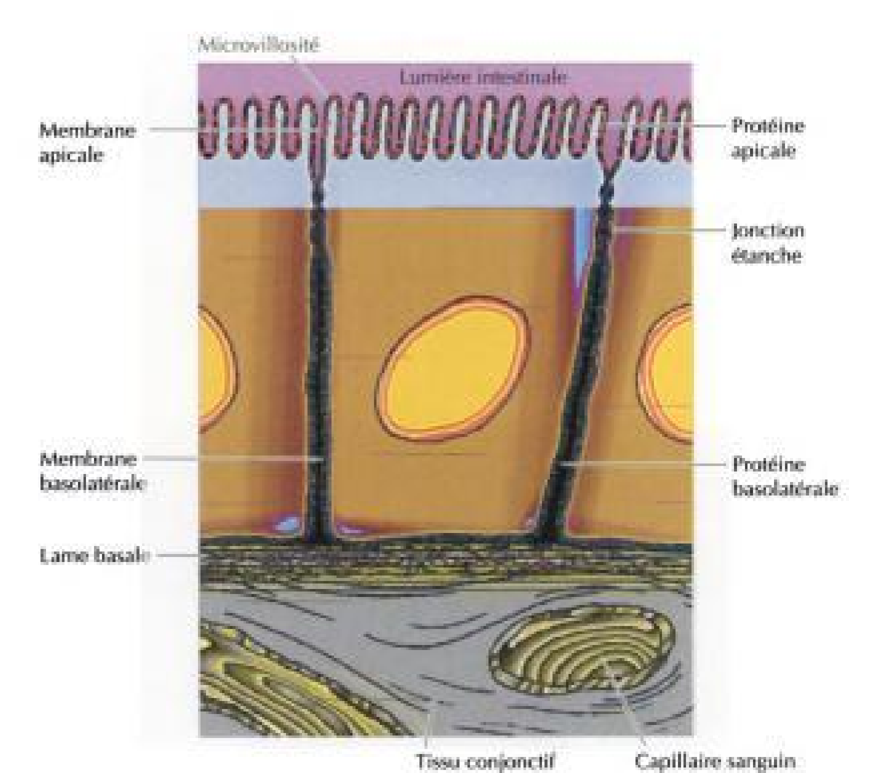


Figure 12.12
Cellule polarisée de l'épithélium intestinal. La face apicale de cette cellule comporte des villosités et son rôle est d'absorber les aliments de la lumière du tube digestif. Le rôle de la face basolatérale est de transférer les aliments absorbés au tissu conjonctif, qui contient les capillaires sanguins. Le domaine apical de la membrane plasmique est séparé de son domaine basolatéral par les jonctions étanches. Les protéines membranaires diffusent librement au sein de chacun de ces domaines, mais ne passent pas d'un domaine à l'autre.

mobilité des protéines membranaires est confinée aux domaines appropriés de la surface cellulaire. Une partie au moins des mécanismes impliqués comprend la formation de jonctions serrées (décrites plus loin dans ce chapitre) entre cellules conjointes de l'épithélium ; ces jonctions ne font pas que sceller l'espace intercellulaire, elles barrent aussi la route aux protéines et aux lipides membranaires. C'est pourquoi les protéines diffusent facilement soit dans le domaine apical, soit dans le domaine basolatéral de la membrane plasmique, mais sans jamais passer d'un domaine à l'autre.

Le glycocalyx

Comme on l'a déjà mentionné, la partie extracellulaire des protéines de membrane plasmique est généralement glycosylée ; de même la partie glucidique des glycolipides fait saillie à la face externe de la membrane plasmique. Aussi, la surface de la cellule est-elle couverte d'un manteau de résidus glucidiques, appelé **glycocalyx**, formé des groupes oligosaccharidiques appartenant aux glycolipides et aux glycoprotéines transmembranaires (figure 12.13).

Une des fonctions du glycocalyx est de protéger la surface cellulaire, une autre de servir, par ses groupes oligosaccharidiques, de marqueur aux diverses interactions entre cellules. L'une de ces interactions est l'attachement des globules blancs (leucocytes) aux cellules endothéliales qui bordent la lumière des vaisseaux sanguins, ce qui permet aux leucocytes de quitter le courant sanguin et de provoquer une réaction inflammatoire dans les tissus lésés. La prise de contact entre un leucocyte et les cellules endothéliales est due à une famille de protéines transmembranaires appelées **sélectines**, qui reconnaissent des groupes glucidiques singuliers à la surface d'une cellule (figure 12.14). La cellule endothéliale exprime deux membres de la famille des sélectines (la sélectine E et la sélectine P) qui s'attachent à des oligosaccharides particuliers à la surface des leucocytes ; une autre sélectine (la sélectine L) est exprimée par les leucocytes et reconnaît un oligosaccharide de la surface des cellules endothéliales. Les oligosaccharides exposés à la surface des cellules représentent donc une série de marqueurs qui contribuent à l'identification de tel ou tel type cellulaire d'un organisme pluricellulaire.

TRANSPORT DE PETITES MOLÉCULES

La cellule maintient la particularité de son cytoplasme parce que la membrane plasmique est sélectivement perméable aux petites molécules. Comme peu de biomolécules sont capables de passer la bicouche phospholipidique, la membrane plasmique constitue une barrière qui s'oppose au libre échange de molécules entre le cytoplasme et le milieu extérieur à la cellule. Ce sont des protéines spécialisées dans le transport (protéines de transport et protéines tunnel) qui font passer sélectivement les petites molécules

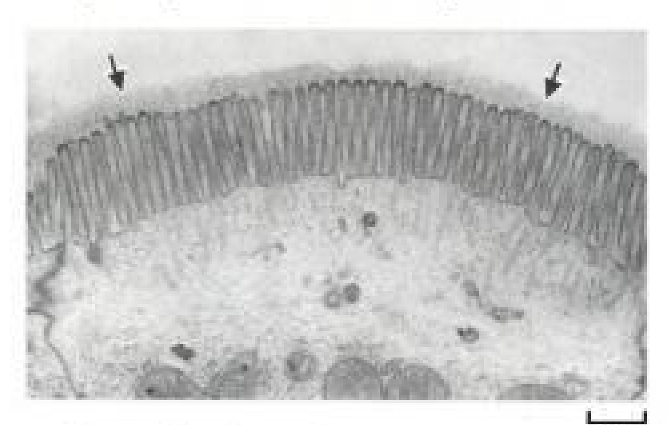


Figure 12.13
Le glycocalyx. Micrographie électronique d'une coupe d'épithélium intestinal montrant le glycocalyx (flèches). (Don Fawcett/Visuals Unlimited).

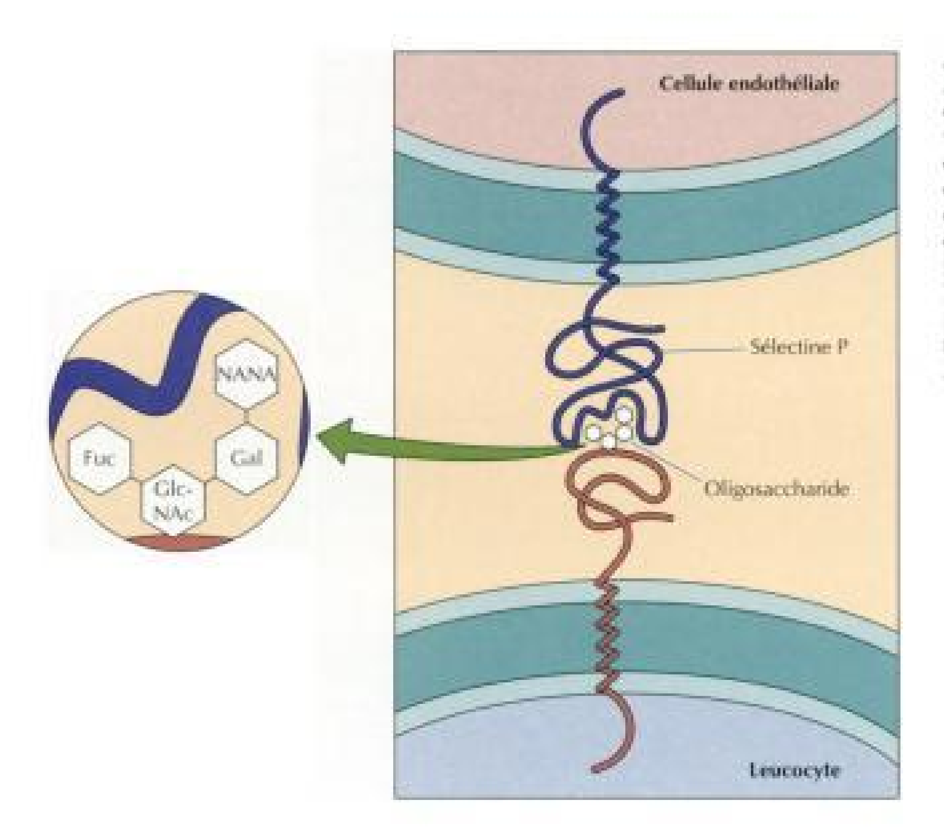


Figure 12.14
Attachement de sélectines sur un oligosaccharide. La sélectine P est une protéine transmembranaire exprimée par les cellules endothéliales ; elle s'attache à un oligosaccharide exprimé à la surface des leucocytes. L'oligosaccharide reconnu par la sélectine P contient de la *N*-acétylglucosamine (GlcNAc), du fucose (Fuc), du galactose (Gal) et du sialate (*N*-acétylneuraminate, ou NANA).

à travers la membrane, de façon à fixer la composition du cytoplasme.

Diffusion passive

Le moyen le plus direct pour une petite molécule de franchir une membrane plasmique est la **diffusion passive** ; pour ce faire, il suffit que la molécule passe en solution dans la bicouche phospholipidique, y diffuse puis repasse en solution aqueuse de l'autre côté de la membrane. Aucune protéine membranaire n'intervient dans ce processus et le sens du flux de cette molécule ne dépend que de ses concentrations relatives à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule. Le flux net d'une molécule suit toujours son gradient de concentration, à savoir du compartiment de concentration la plus élevée vers un compartiment de concentration plus basse.

La diffusion passive est donc un processus général par lequel n'importe quelle molécule soluble dans la bicouche phospholipidique traverse la membrane plasmique jusqu'à ce que ses concentrations s'équilibrent entre chacun des compartiments qui la bordent. Notons bien que seules les petites molécules relativement hydrophobes sont capables de diffuser à travers une bicouche phospholipidique à vitesse appréciable (figure 12.15) ; c'est le cas de gaz comme O_2 et CO_2, d'une molécule hydrophobe comme le benzène et de petites molécules polaires mais non chargées, comme H_2O et l'éthanol. Les autres biomolécules n'ont pas le pouvoir de se dissoudre dans le cœur hydrophobe de la bicouche phospholipidique ; aussi les plus grandes molécule polaires non chargées, comme le glucose, ne traversent pas la membrane plasmique par diffusion passive ; il en est de même des molécules chargées, quelle que soit leur taille, y compris les petits ions comme H^+, Na^+, K^+ et Cl^-. Ces petites molécules ne passent la membrane que par le truchement de protéines de transport ou de protéines-tunnel, qui, pour cette raison, dirigent le trafic de la plupart des biomolécules aux frontières de la cellule.

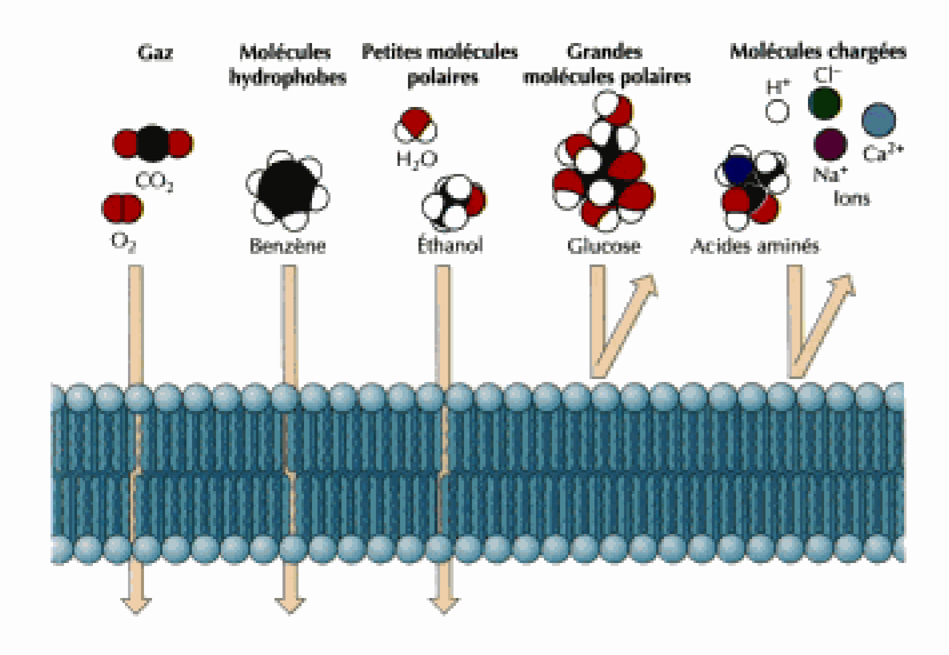


Figure 12.15
Perméabilité d'une bicouche phospholipidique. Les gaz, les molécules hydrophobes et les petites molécules polaires non chargées peuvent diffuser à travers la bicouche phospholipidique, mais les grandes molécules polaires et chargées ne le peuvent pas.

Diffusion facilitée et protéines porteuses

Comme la diffusion passive, la **diffusion facilitée** désigne une diffusion de molécules dans le sens fixé par leur concentrations relatives à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule, sans apport d'aucune énergie libre extérieure, puisque les molécules suivent leur gradient de concentration et, dans le cas des molécules chargées, le potentiel électrique établi à travers la membrane. Cependant, la diffusion facilitée diffère de la diffusion passive par le fait que les molécules transférées ne se dissolvent pas dans la bicouche phospholipidique, mais sont prises en charge par des protéines qui leur font passer la membrane en les protégeant de tout contact avec son cœur hydrophobe. Aussi la diffusion facilitée permet-elle aux molécules polaires et chargées, comme les sucres, les acides aminés, les nucléosides et les ions, de traverser la membrane plasmique.

On distingue habituellement deux types de protéines impliquées dans la diffusion facilitée, à savoir les protéines porteuses et les protéines à tunnel. Les protéines porteuses, ou **perméases**, séquestrent d'un côté de la membrane les molécules à transférer, puis subissent un changement de conformation qui pousse la molécule à travers la membrane et la libère sur l'autre face. Par contre, les **protéines tunnels** ou **conductines** (voir la section suivante) ménagent des pores ouverts à travers la membrane, qui laissent diffuser toute molécule de charge et de taille appropriée.

Aux perméases, on doit la diffusion facilitée des sucres, des acides aminés et des nucléosides à travers la membrane plasmique de la plupart des cellules. Le transport de glucose, source primordiale d'énergie métabolique, est un des principaux rôles de transporteur dévolu à la membrane plasmique ; sa perméase au glucose est un exemple classique de protéine porteuse. Elle fut identifiée comme une protéine de 55 kDa isolée du globule rouge humain ; elle constitue 5 % de sa fraction protéique membranaire. L'isolement et le séquençage ultérieur d'un clone d'ADNc révélèrent que la perméase au glucose comporte 12 segments transmembranaires α-hélicoïdaux, une structure typique de beaucoup de protéines porteuses (figure 12.16) ; ces hélices α transmembranaires contiennent surtout des résidus d'acide aminé hydrophobes, mais certaines d'entre elles comportent aussi des acides aminés polaires qui feraient partie du site de liaison du glucose à l'intérieur de la protéine.

Comme celle de beaucoup d'autres protéines membranaires, la structu-

dans l'autre sens, par un renversement des étapes décrites dans la figure 12.17 ; ce flux inversé de glucose a lieu, par exemple, dans l'hépatocyte, qui synthétise du glucose et l'injecte dans le courant sanguin.

Tunnels à ions

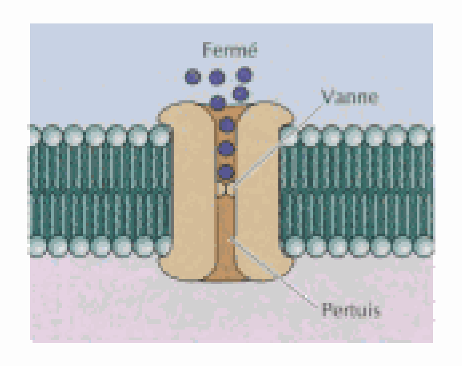
Contrairement aux perméases, les protéines tunnel ne font que ménager un pore ouvert à travers la membrane, pour le libre passage des molécules de taille et de charge appropriées à travers la bicouche lipidique. Un groupe de protéines tunnel déjà décrites sont les porines, qui laissent passer les petites molécules polaires et les ions à travers la membrane externe des bactéries (voir figure 12.8). Les protéines tunnel laissent aussi passer les molécules entre des cellules unies par des jonctions communicantes, décrites plus loin dans ce chapitre. La membrane plasmique de nombreuses cellules contient aussi des protéines tunnel perméables à l'eau (aquaporines), par lesquelles les molécules d'eau diffusent beaucoup plus rapidement qu'elles ne le font à travers la bicouche phospholipidique. Cependant, les protéines tunnel le mieux caractérisées sont les **canaux,** ou **tunnels, à ions**, qui livrent passage aux ions à travers les membranes plasmiques ; bien que des tunnels à ions soient présents dans les membranes de toutes les cellules, on a étudié particulièrement ceux du nerf et du muscle, où leur ouverture et fermeture modulée commande la transmission des signaux électriques.

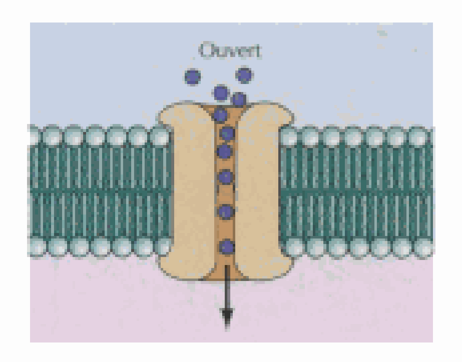
Le fonctionnement des tunnels à ions repose sur trois propriétés essentielles (figure 12.18). Premièrement, le passage des ions y est très rapide ; au moins un million d'ions par seconde traversent un tunnel ouvert, soit mille fois plus que la quantité transportée par une perméase. Deuxièmement, les tunnels à ions sont extrêmement sélectifs car l'étroitesse de leur pore n'admet que les ions de charge et de taille appropriées : ainsi des conductines membranaires spécifiques sont perméables aux ions Na^+, K^+, Ca^{2+} ou Cl^-. Troisièmement, les conductines à ions ne s'ouvrent pour la plupart que de façon intermittente, commandées par une « porte » qui cède dès la réception de certains stimuli. Certaines, **les tunnels à ions commandés par un ligand**, deviennent perméables quand ils ont séquestré un neuromédiateur ou tout autre molécule messagère ; d'autres, les **tunnels à ions commandés par le potentiel membranaire** (ou **tunnels voltaïques)** s'ouvrent lors d'une modification adéquate du potentiel électrique de la membrane plasmique.

Le rôle essentiel joué par les conductines à ions dans la transmission des impulsions électriques fut élucidé grâce à une série d'élégantes expériences effectuées en 1952 par Alan Hodgkin et Andrew Huxley avec l'axone géant de calmar comme modèle. L'axone de ces neurones géants a un diamètre d'environ 1 mm, au point qu'il est possible d'y insérer des électrodes et de mesurer les modifications de potentiel membranaire qui s'y produisent durant la transmission des influx nerveux. Avec ce matériel, Hodgkin et Huxley démontrèrent que les modifications de potentiel membranaire sont dues à l'ouverture et à la fermeture sur commande des tunnels à Na^+ et à K^+ de la membrane plasmique. On a pu par la suite étudier l'activité d'un seul tunnel, grâce à la **méthode de blocage du potentiel** (en anglais, méthode du **patch-clamp**) mise au point par Erwin Neher et Bert Sakman en 1976 (figure 12.19) : à l'aide d'une pipette dont la pointe ne dépasse pas 1 µm de diamètre, on prélève un petit lambeau de membrane qui permet de suivre le flux d'ions à travers un seul tunnel, améliorant de façon notable la précision avec laquelle on suit l'activité d'une conductine à ions.

Ce flux d'ions à travers les tunnels membranaires dépend de l'existence de gradients ioniques à travers la membrane plasmique. Toutes les cellules, y compris celles du muscle et celles du nerf, contiennent des pompes à ions (décrites à la section suivante) qui utilisent l'énergie de l'ATP pour transporter activement des ions à travers la membrane plasmique ; pour cette raison, la composition ionique du cytoplasme est sensiblement différente de celle du milieu extracellulaire (tableau 12.1). L'ion Na^+ est ainsi pompé acti-

Figure 12.18
Modèle de tunnel à ions. Dans sa conformation fermée, le flux d'ions est bloqué par une vanne. Quand celle-ci se dégage, les ions filent rapidement à travers le tunnel ; celui-ci comporte un étroit pertuis qui ne laisse passer que les ions de taille et de charge appropriées.





vement hors de la cellule, alors que K^+ est pompé vers le cytoplasme. Dans l'axone géant de calmar, la concentration d'ions Na^+ est environ 10 fois moins élevée que celle des liquides extracellulaires, tandis que la concentration d'ions K^+ est quelque 20 fois plus élevée dans le cytosol que dans le milieu environnant.

Comme les ions sont des particules électriquement chargées, leur transport génère un gradient électrique à travers la membrane plasmique. Dans l'axone géant de calmar au repos, il existe un potentiel électrique d'environ 60 mV, le cytosol étant chargé négativement par rapport au milieu extracellulaire (figure 12.20). Ce potentiel électrique est dû à la fois aux pompes à ions et au flux d'ions à travers les tunnels restés ouverts dans la membrane plasmique de l'axone au repos ; comme cette membrane porte des tunnels à K^+ ouverts, elle est plus perméable aux ions K^+ qu'aux ions Na^+ ou qu'aux autres ions. C'est donc le flux de K^+ qui contribue le plus au potentiel membranaire de repos.

Comme on l'a mentionné au chapitre 10, le flux d'ions à travers une membrane est entraîné à la fois par la composante « concentration » et par la composante « différence de potentiel » d'un gradient électrochimique ; ainsi, le rapport de 20 entre la concentration de K^+ dans le cytosol et dans le milieu extracellulaire chasse K^+ hors de la cellule. Comme K^+ porte une charge positive, cette fuite hors de la cellule engendre un potentiel électrique à travers la membrane, l'intérieur de la cellule devenant négatif ; ce potentiel s'oppose graduellement à la fuite de K^+ hors de la cellule avant d'atteindre un équilibre où le potentiel membranaire compense le gradient de concentration de K^+.

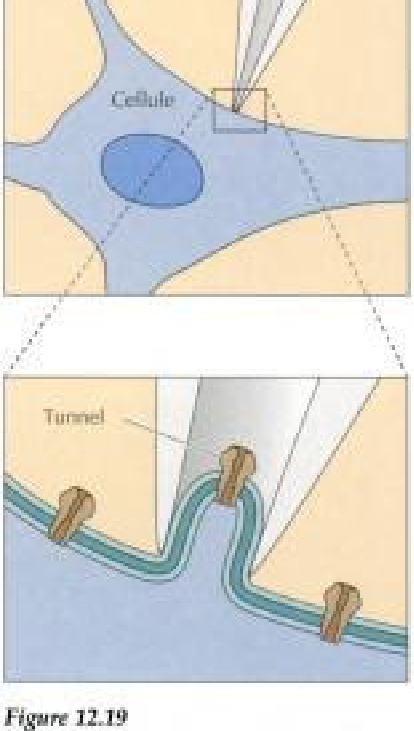


Figure 12.19
Méthode de blocage du potentiel d'une plage membranaire (patch clamp). On prélève une minuscule parcelle de membrane sur la pointe d'une micropipette ; on lance ensuite des stimuli de l'intérieur de la pipette et on mesure la réponse du tunnel emprisonné. (D'après E. Neher et B. Sakman, 1992, *Sci. Amer.* **266** :44)

Figure 12.20
Gradients ioniques et potentiel membranaire de repos dans l'axone géant de calmar. On n'a indiqué que les concentration des ions Na^+ et K^+, car seuls ces deux ions interviennent dans la transmission des influx nerveux. Grâce à la pompe, Na^+ est chassé de la cellule, K^+ est propulsé vers le cytoplasme, de sorte que la concentration d'ions Na^+ est plus élevée à l'extérieur de l'axone et que celle de K^+ est plus élevée à l'intérieur de l'axone. Au repos, la membrane est plus perméable à K^+ qu'à Na^+ ou aux autres ions car elle comporte des tunnels à K^+ ouverts. Le flux sortant de ces ions K^+ à travers ces tunnels est la cause principale du potentiel membranaire de repos de 60 mV, très proche du potentiel d'équilibre des ions K^+.

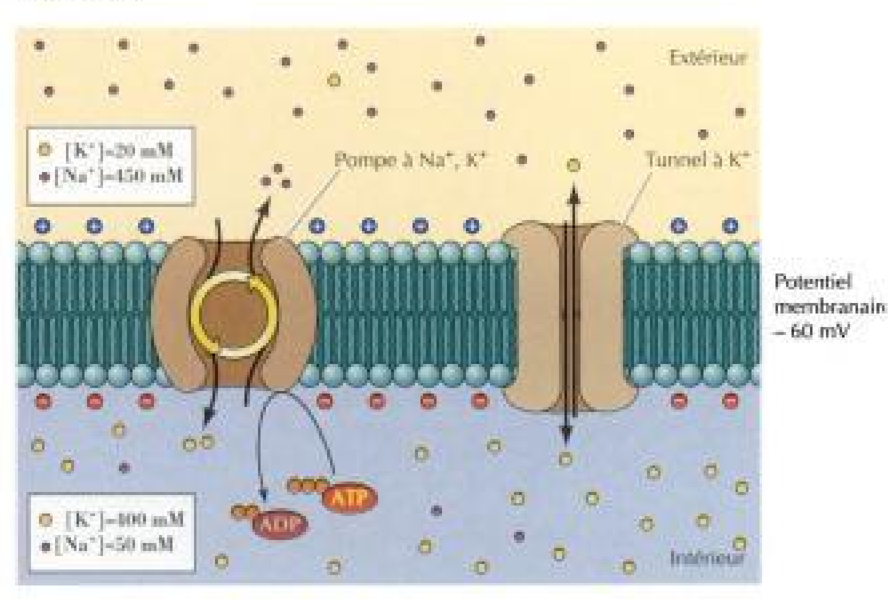


Table 12.1 Concentrations extracellulaire et intracellulaire d'ions

	Concentration (mM)	
Ion	**Intracellulaire**	**Extracellulaire**
Axone de calmar		
K^+	400	20
Na^+	50	440
Cl^-	40–150	560
Ca^{2+}	0.0001	10
Cellule de mammifère		
K^+	140	5
Na^+	5–15	145
Cl^-	4	110
Ca^{2+}	0.0001	2.5–5

Le potentiel membranaire est donné en fonction de la concentration d'un ion donné par l'**équation de Nernst :**

$$V = \frac{RT}{zF} \ln \frac{C_e}{C_i}$$

dans laquelle V est le potentiel membranaire d'équilibre en volts, R la constante des gaz, T la température absolue, z la charge de l'ion, F la constante de Faraday, et C_e et C_i les concentrations de l'ion à l'extérieur et à l'intérieur de la cellule. Il existe un potentiel d'équilibre séparé pour chaque ion et le potentiel membranaire est fixé par le flux de tous les ions qui traversent la membrane. Comme l'axone de calmar au repos est plus perméable aux ions K^+ qu'aux ions Na^+ ou aux autres ions (y compris Cl^-), son potentiel membranaire de repos (-60 mV) est proche du potentiel d'équilibre fixé par les concentrations intracellulaire et extracellulaire de K^+ (-75 mV).

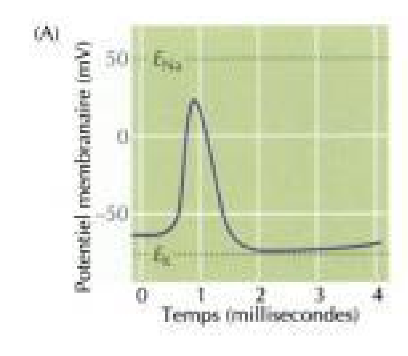
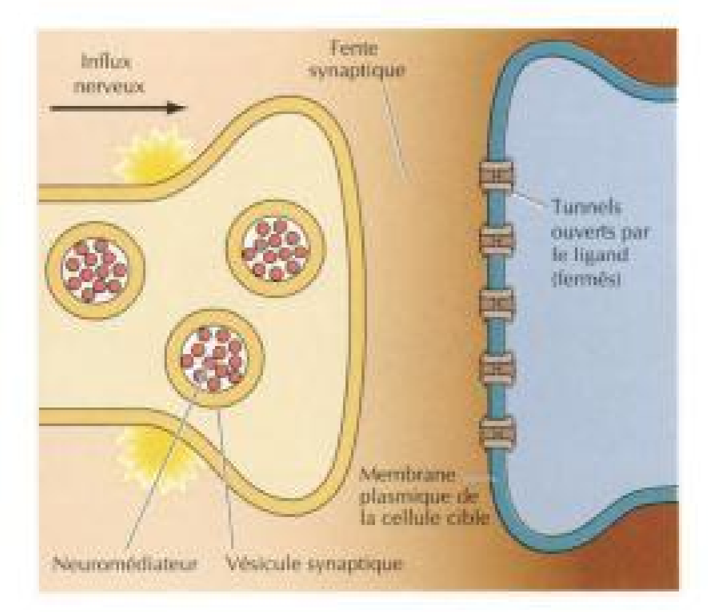


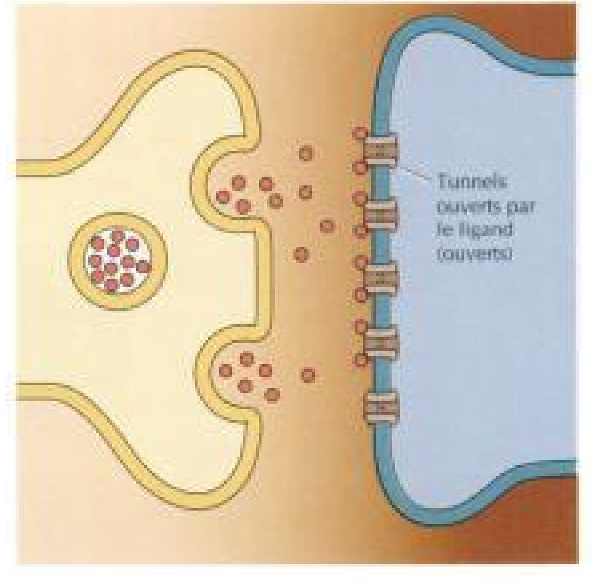
Figure 12.21
Potentiel membranaire et tunnels à ions pendant le potentiel d'action. (A) Modification du potentiel de membrane en un point donné de l'axone géant de calmar après un stimulus. E_{Na} et E_K sont les potentiels d'équilibre respectifs de Na^+ et K^+. (B) Le potentiel membranaire s'élève d'abord, dès que s'ouvrent les tunnels voltaïques à Na^+, puis retombe sous sa valeur de repos au moment où les tunnels à Na^+ sont inactivés et où les tunnels voltaïques à K^+ s'ouvrent. Ceux-ci sont ensuite inactivés et le potentiel de membrane retourne à sa valeur de repos.

Quand un influx nerveux (**potentiel d'action**) se propage le long d'un axone, la membrane se dépolarise (figure 12.21). Son potentiel passe de -60 mV à environ +30 mV en moins d'une milliseconde, puis redevient négatif pour atteindre la valeur de repos. Ces variations sont dues à l'ouverture et à la fermeture rapides des tunnels voltaïques à Na^+, suivie de peu par celles des tunnels à ions K^+ ; de relativement petites variations initiales du potentiel membranaire (de -60 à -40 mV environ) enclenchent l'ouverture instantanée des tunnels à Na^+ ; ceci provoque un afflux de Na^+ dans la cellule, sous la poussée et de son gradient de concentration et du potentiel membranaire. L'entrée brutale d'ions Na^+ provoque une grande variation du potentiel membranaire, qui s'approche des +30 mV, valeur proche du potentiel d'équilibre de l'ion Na^+ qui est d'environ + 50 mV. Dès ce moment, les tunnels à Na^+ sont inactivés et les tunnels à K^+ s'ouvrent, permettant une fuite rapide d'ions K^+ hors de la cellule, sous la poussée du potentiel membranaire et du gradient de concentration ; le potentiel membranaire s'abaisse rapidement jusqu'à -75 mV, potentiel d'équilibre de l'ion K^+. Puis les tunnels à K^+ deviennent inactifs à leur tour et le potentiel membranire revient à sa valeur de repos de -60 mV, fixée par le flux de K^+ et d'autres ions à travers les tunnels qui restent ouverts dans la cellule non stimulée.

La dépolarisation subséquente des régions de la membrane plasmique adjacente à la zone qui a subi la dépolarisation initiale permet au potentiel d'action de descendre tout le long de l'axone des neurones sous la forme d'un signal électrique, transmettant rapidement les influx nerveux sur de longues distances ; en effet, l'axone de certains neurones moteurs humains atteint au moins un mètre. L'arrivée d'un potentiel d'action à la terminaison de la plupart des neurones enclenche la libération d'un neuromédiateur, par exemple d'acétylcholine, qui relaie le signal vers une autre cellule au niveau d'une synapse (figure 12.22). Le neuromédiateur libéré par la cellule présynaptique se fixe à des récepteurs siégeant dans la membrane de la cellule postsynaptique, récepteurs qui commandent l'ouverture de tunnels à ions (commandés par un ligand). Parmi ce type de tunnel, un des mieux caractérisés est le récepteur d'acétylcholine de la cellule musculaire. Dès que ce récepteur reçoit une molécule d'acétylcholine, s'ouvre en son sein un tunnel qui est perméable au Na^+ et au K^+ ; ceci permet une entrée rapide d'ions Na^+ qui dépolarise la membrane de la cellule musculaire et déclenche un potentiel d'action ; celui-ci va provoquer l'ouverture de tunnels voltaïques à Ca^{2+} et faire monter la concentration cytosolique de Ca^{2+}, signal de la contraction du muscle (voir figure 11.25).

Figure 12.22
Signalisation par un neuromédiateur libéré dans une synapse. L'arrivée d'un influx nerveux à une terminaison neuronale enclenche la fusion de vésicules synaptiques avec la membrane plasmique ; ce faisant, la cellule présynaptique libère le neuromédiateur dans la fente synaptique. Le neuromédiateur est capturé par un récepteur et déclenche l'ouverture, dans la membrane plasmique de la cellule cible, de tunnels à ions commandés par le ligand.





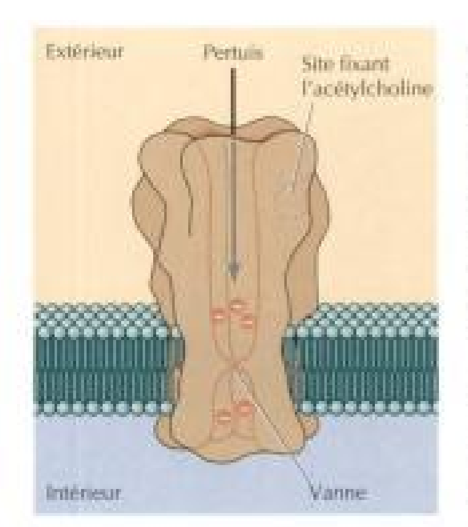


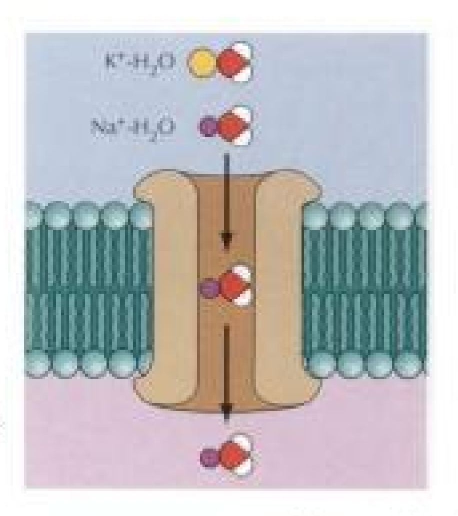
Figure 12.23
Modèle du récepteur d'acétylcholine. Le récepteur comporte cinq protomères arrangés autour d'un pertuis central. Dès qu'une molécule d'acétylcholine atteint un site de la région extracellulaire du récepteur, celui-ci subit un remaniement allostérique qui ouvre la vanne du tunnel. Le pertuis du tunnel est bordé de résidus d'acides aminés portant une charge négative qui s'oppose au passage des ions de charge négative. (D'après N. Unwin, 1993, *Cell* **72**/Neuron 10 (Suppl.) :31)

Le récepteur d'acétylcholine, isolé d'abord à partir de l'organe électrique de la raie *Torpedo* dans les années '70, est le prototype du tunnel commandé par un ligand. Il est formé de cinq protomères arrangés en cylindre au sein de la membrane (figure 12.23). On pense qu'à l'état fermé la cavité du tunnel est obstruée par les chaînes latérales d'acides aminés hydrophobes. La séquestration d'acétylcholine entraîne un changement de conformation du récepteur qui chasse ces chaînes latérales hydrophobes hors du tunnel, ménageant un pore qui laisse passer les ions positifs, notamment Na^+ et K^+. Cette ouverture reste cependant imperméable aux ions de charge négative, comme Cl^-, car elle est bordée de résidus d'acide aminé chargés négativement.

Le tunnel voltaïque à Na^+ et le tunnel voltaïque à K^+ font preuve d'une plus grande spécificité d'ion ; le tunnel à Na^+ est plus de dix fois plus perméable aux ions Na^+ qu'aux ions K^+ et le tunnel à K^+ est cent fois plus perméable aux ions K^+ qu'aux ions Na^+. On explique en partie la sélectivité du tunnel à Na^+ par l'étroitesse du pertuis, qui agit comme un tamis ; le rayon de l'ion Na^+ est inférieur à celui de K^+ et il semble que le tunnel à Na^+ soit suffisamment étranglé pour barrer la voie aux ions K^+ et à ceux de taille supérieure (figure 12.24).

Le tunnel à K^+ est également très étroit et s'oppose au passage des ions de plus grand diamètre, mais comme le rayon ionique de Na^+ est inférieur, on ne s'attend pas à la perméabilité sélective de ces tunnels en faveur de K^+. On pense que cette sélectivité est due à des interactions entre K^+ et des chaînes latérales d'acide aminé polaires bordant le pertuis ; ces interactions déplaceraient les molécules d'eau qui couvrent l'ion K^+ et permettraient le passage de l'ion K^+ sous sa forme déshydratée (figure 12.25). Trop petit, en l'état déshydraté, pour entrer en contact avec ces chaînes latérales polaires, l'ion Na^+ conserve sa couche de molécules d'eau et, sous cette forme hydratée, est trop volumineux pour franchir le tunnel.

Les tunnels voltaïques à Na^+, à K^+ et à Ca^{2+} font tous partie d'une grande famille de protéines apparentées (figure 12.26). Le tunnel à K^+ est formé de quatre protomères identiques, comportant chacun six hélices α transmembranaires. Le tunnel à Na^+ et le tunnel à Ca^{2+} ne sont constitués que d'une seule chaîne polypeptidique, mais formée de quatre domaines en série qui correspondent chacun à un protomère du tunnel à K^+. La commutation est commandée par le potentiel *via* l'une des hélices α transmembranaires, pourvues de plusieurs résidus d'acide aminé chargés positivement. La dépolarisation de la membrane pousse ces charges positives vers l'extérieur de la cellule, déplaçant de ce fait le segment transmembranaire et ouvrant le tunnel. L'inactivation rapide du tunnel à Na^+ et du tunnel à K^+ dès le passage du potentiel d'action est causée par les régions cytoplasmiques de la



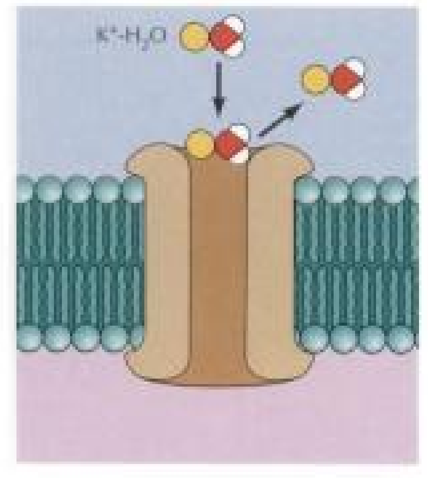
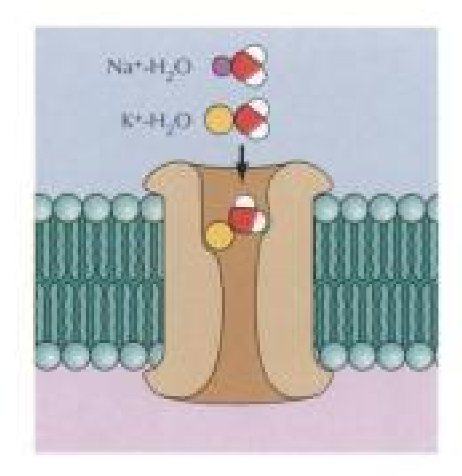
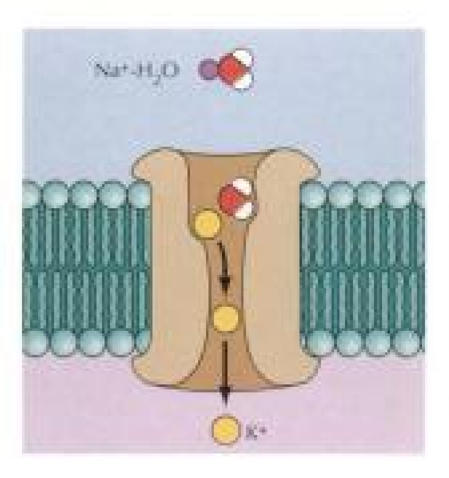


Figure 12.24
Sélectivité ionique des tunnels à Na+. Ln pertuis étroit laisse passer l'ion Na^+ chargé d'une seule molécule d'eau, mais empêche le passage de K^+ ou des ions plus volumineux.





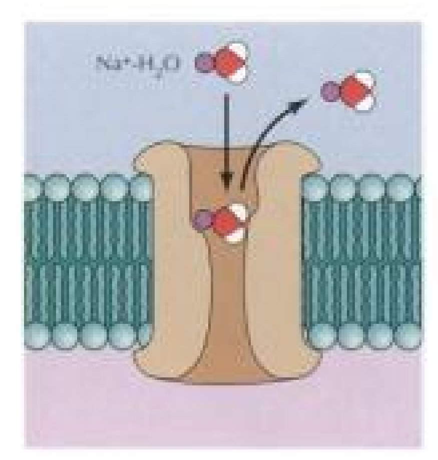
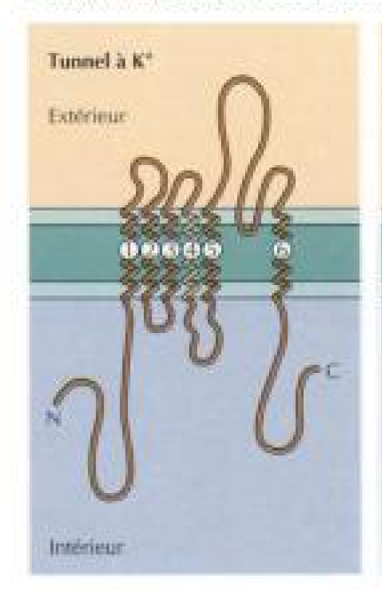


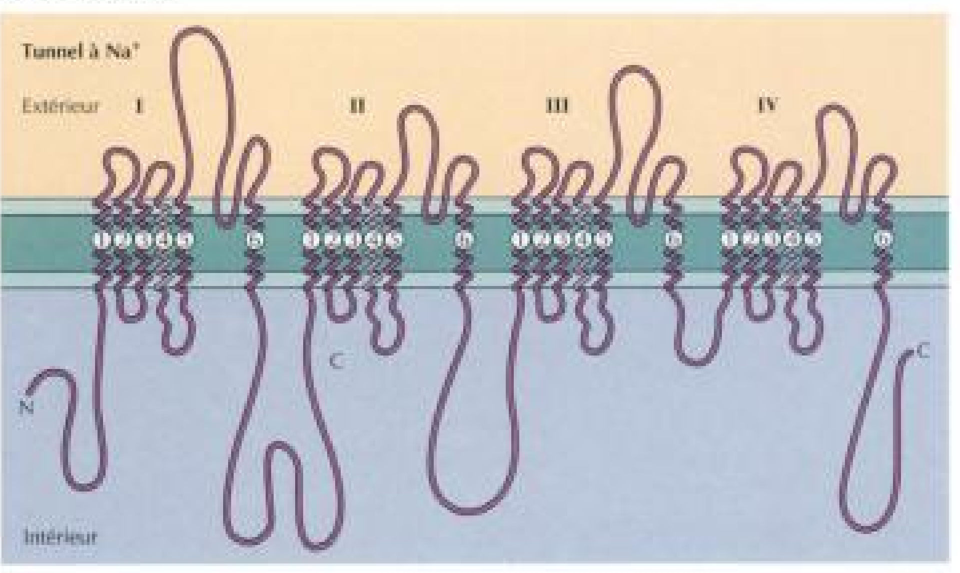
Figure 12.25
Sélectivité ionique des tunnels à K^+. Le pertuis du tunnel à K^+ a la taille appropriée pour admettre l'ion K^+ dont toutes les molécules d'eau ont été remplacées par des interactions avec les chaînes latérales des résidus d'acide aminé polaires bordant le pertuis. Comme l'ion Na^+ est trop petit pour entrer en contact avec ces chaînes latérales d'acide aminé, il reste attaché à sa molécule d'eau : vu sa taille, ce complexe ne pénètre pas dans le pertuis.

chaîne polypeptidique, qui se fixent à l'orifice cytoplasmique du pertuis et font obstacle au passage des ions (figure 12.27).

Tout une série de tunnels à ions (y compris ceux à Ca^{2+} et ceux à Cl^-) répondent à divers neuromédiateurs ou s'ouvrent et se ferment avec une cinétique propre lors de la dépolarisation membranaire. L'action concertée de ces nombreux tunnels rend compte de la complexité de la transmission des signaux dans le système nerveux. En outre, comme on le verra au chapitre suivant, le rôle des tunnels à ions ne se limite pas aux cellules électriquement excitables du nerf et du muscle, ils jouent un rôle primordial dans la transmission de signaux à d'autres types de cellules. L'ouverture et la fermeture sur commande des tunnels à ions pourvoit donc la cellule d'un

Figure 12.26
Structure des tunnels à ions commandés par le potentiel membranaire (tunnels voltaïques). Les tunnels à K^+, comme ceux à Na^+ et ceux à Ca^{2+}, forment une famille de protéines. Le tunnel à K^+ est constitué de quatre protomères identiques, dont un seul est représenté. Le tunnel à Na^+ est constitué d'une seule chaîne polypeptidique comportant quatre domaines, chacun fort semblable au protomère du tunnel à K^+. Le tunnel à Ca^{2+} est semblable au tunnel à Na^+. Chaque protomère ou domaine comprend six hélices α transmembranaires ; l'hélice α marquée 4 contient plusieurs résidus d'acide aminé chargés positivement et sert de jauge de potentiel grâce à laquelle les variations du potentiel de membrane commandent l'ouverture ou la fermeture du tunnel.





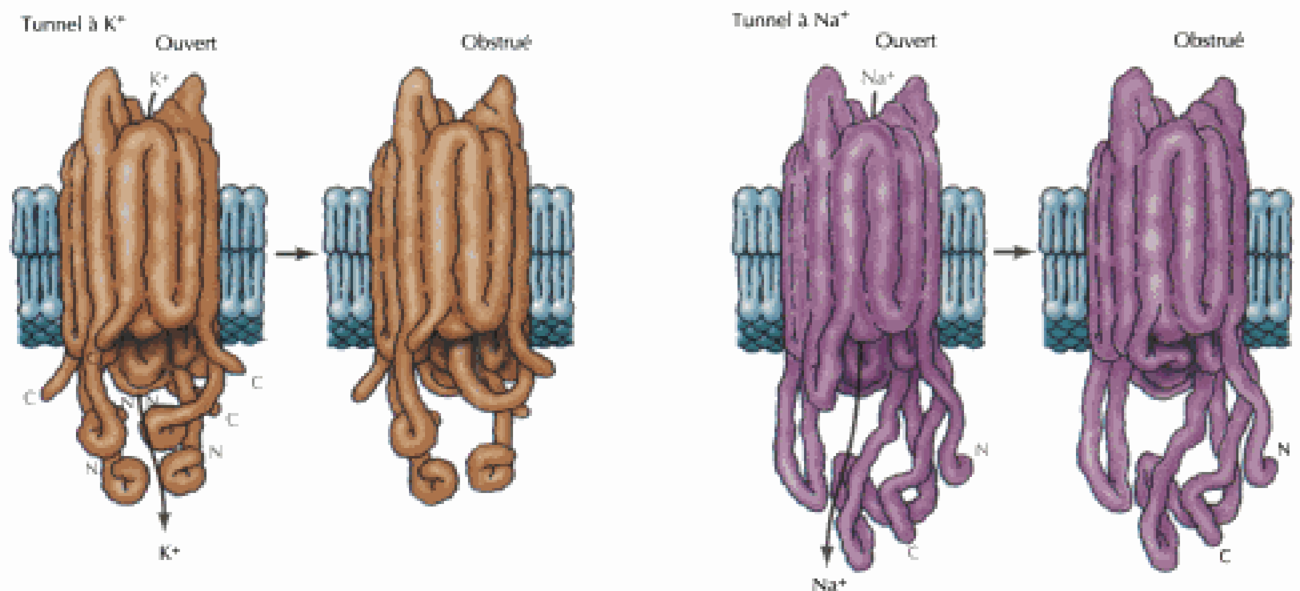


Figure 12.27
Inactivation des tunnels à K^+ et des tunnels à Na^+. Sitôt ouverts par une variation du potentiel membranaire, les tunnels à K^+ et les tunnels à Na^+ sont inactivés par attachement de certaines zones cytoplasmiques de la chaîne polypeptidique à l'orifice du pertuis. Dans le cas du tunnel à K^+, le mécanisme est du type bouchon enchaîné ; le bouchon est formé par le bout aminé de la chaîne polypeptidique. Dans le tunnel à Na^+, l'inactivation est due à la boucle intracellulaire reliant le domaine III au domaine IV.

mécanisme sensible et malléable pour répondre à tout une série de stimuli reçus du milieu environnant.

Transport actif entraîné par l'énergie de l'ATP

Dans la diffusion facilitée par des protéines porteuses ou des protéines pourvues d'un tunnel, le flux net de molécules va toujours dans le sens thermodynamique, c'est-à-dire en descendant le gradient électrochimique établi à travers la membrane. Cependant, la cellule doit transporter de nombreuses molécules à l'encontre de leur gradient de concentration. Dans le **transport actif**, c'est l'énergie fournie par une réaction couplée (par exemple, la scission de l'ATP) qui entraîne le transport des molécules dans le sens défavorisé au point de vue thermodynamique.

Les **pompes à ions** responsables du maintien des gradients ioniques à travers la membrane plasmique fournissent les principaux exemples de transports actifs dus à l'énergie de l'ATP. Comme on l'a déjà mentionné (voir tableau 12.1), la concentration de Na^+ est environ dix fois plus élevée à l'extérieur qu'à l'intérieur de la cellule, tandis que celle de K^+ est plus élevée à l'intérieur qu'à l'extérieur de la cellule. Ces gradients d'ions sont entretenus par la **pompe à Na^+-K^+** (ou **Na^+-K^+ ATPase**), qui consomme l'énergie d'hydrolyse de l'ATP pour transporter les ions Na^+ et K^+ contre leur gradient électrochimique ; ce processus implique une transconformation de la pompe sous l'effet de l'ATP (figure 12.28). Les ions Na^+ commencent par se fixer à des sites de haute affinité présents à l'intérieur de la cellule ; cette fixation stimule la phosphorylation de la pompe par l'ATP, entraînant un changement de conformation qui pousse les sites à Na^+ sur la face extracellulaire de la membrane tout en diminuant leur affinité envers les ions Na^+ ; aussi ceux-ci sont-ils libérés dans le milieu extracellulaire. A ce moment, la pompe porte sur sa face extracytoplasmique des sites de haute affinité envers K^+ ; la fixation d'ions K^+ extracellulaires à ces sites provoque l'hydrolyse des groupes phosphate liés à la pompe, entraînant un autre changement de conformation, qui amène les sites à K^+ au contact du cytosol et abaisse leur affinité envers l'ion ; ceux-ci sont alors libérés dans le cytosol. La pompe comporte trois sites de liaison pour Na^+ et deux pour K^+, de sorte que chaque cycle transfère trois ions Na^+ et deux ions K^+ à travers la membrane plasmique en consommant l'énergie d'une molécule d'ATP.

Dans maintes cellules animales, l'importance de la pompe à Na^+-K^+ est révélée par le fait qu'elle y consomme près de 25 % de l'ATP produit. Un des rôles primordiaux des gradients de Na^+ et de K^+ engendrés par cette

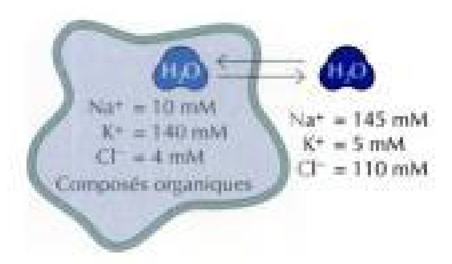


Figure 12.29
Gradients ioniques à travers la membrane plasmique de la cellule de mammifère. Les ions Na^+ et Cl^- sont plus concentrés dans le milieu que dans la cellule, tandis que l'ion K^+ est plus concentré dans la cellule qu'à l'extérieur. Les teneurs élevées en Na^+ et Cl^- compensent la haute concentration cytosolique de substances organiques, équilibrant les pressions osmotiques pour empêcher un flux entrant net d'eau.

Le transport actif de Ca^{2+} à travers la membrane plasmique est dû à une pompe à ions qui est structurellement apparentée à la pompe à Na^+-K^+ et est mue aussi par l'ATP ; comme cette pompe à Ca^{2+} expulse les ions Ca^{2+} hors de la cellule, la concentration intracellulaire d'ions Ca^{2+} est très basse, de l'ordre de 0,1 µM, alors qu'elle est d'environ 0,1 mM à l'extérieur de la cellule. Cette faible concentration d'ions Ca^{2+} dans le cytoplasme rend la cellule extrêmement sensible aux petits accroissements de la teneur intracellulaire en Ca^{2+} ; ces poussées transitoires de concentration intracellulaire d'ions Ca^{2+} jouent un rôle clé dans la transmission des signaux, comme on l'a déjà vu dans la contraction musculaire (voir figure 11.25) et comme on l'expliquera dans le chapitre suivant.

Des pompes à ions de même nature implantées dans la membrane plasmique des bactéries, des levures et des cellules végétales effectuent un transport actif d'ion H^+ hors de la cellule ; en outre, les ions H^+ sont activement pompés hors des cellules de l'épithélium gastrique, rendant acide le contenu de l'estomac. Des pompes de structure différente effectuent le transport actif de H^+ dans le lysosome et l'endosome (voir figure 9.34). Dans la mitochondrie et le chloroplaste, on trouve encore un autre type de pompe à ions H^+, appelées ATP synthases, puisqu'elles fonctionnent en sens inverse, en utilisant le flux d'ions dans le sens de leur gradient électrochimique pour faire la synthèse d'ATP.

La plus vaste famille de transporteurs membranaires est celle des **transporteurs ABC**, ainsi désignés parce qu'ils comportent un domaine de fixation d'ATP très bien conservé (*ATP binding cassette*)(figure 12.30). On en a identifié plus d'une centaine chez les procaryotes et les eucaryotes. Chez les bactéries, les transporteurs ABC utilisent l'énergie de l'ATP pour se fournir en toutes sortes de molécules, telles que ions, sucres et acides aminés. Dans les cellules d'eucaryote, le premier transporteur ABC découvert fut le produit d'un gène (*mdr*, multidrug resistance, en anglais) qui rend les cellules cancéreuses résistantes à tout une série de médicaments utilisés en chimiothérapie. Le transporteur MDR s'exprime habituellement dans les cellules du foie, de l'intestin et des reins, où il éliminerait les substances étrangères toxiques. Il s'exprime aussi dans les cellules endothéliales des capillaires cérébraux, où son rôle de pompe protège le cerveau des substances toxiques. Malheureusement, le gène *mdr* s'exprime fréquemment à un degré élevé dans les cellules cancéreuses ; ceci y entraîne une importante synthèse de transporteurs MDR, qui reconnaissent de nombreux médicaments et les expulsent de la cellule, rendant ces cellules cancéreuses résistantes à un large

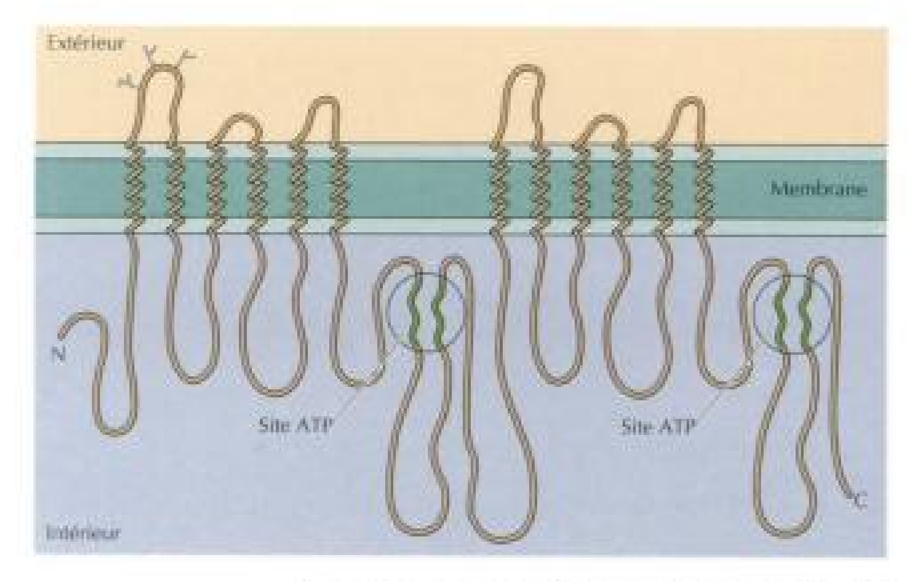


Figure 12.30
Structure d'un transporteur ABC. Un transporteur ABC est formé de six domaines transmembranaires suivis par une cassette de fixation d'ATP. Dans les transporteurs ABC siégeant dans la membrane plasmique (notamment le transporteur MDR schématisé ici), deux de ces protomères sont soudés, de sorte que le transporteur comporte 12 domaines transmembranaires et deux sites de fixation d'ATP.

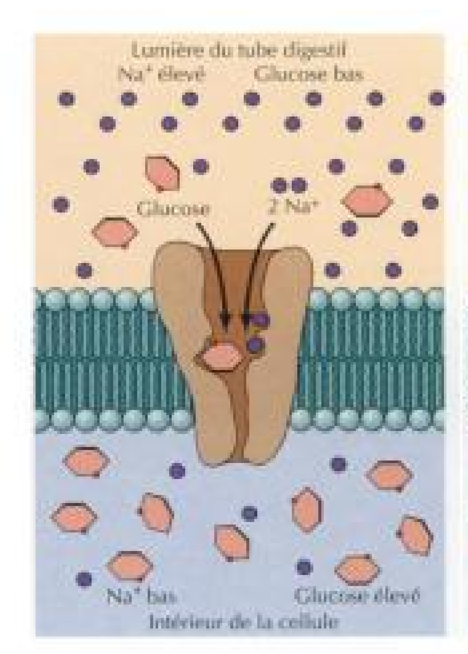
spectre d'agents thérapeutiques et compromettant notablement le traitement des cancers.

Un autre transporteur de la famille ABC, important en médecine, est codé par le gène impliqué dans la mucoviscidose. Quoique membre de la famille ABC, le produit de ce gène (appelé CFTR, pour *modulateur de la conductance membranaire en jeu dans la mucoviscidose*) sert de tunnel à ions Cl^- dans les cellules épithéliales ; la déficience du transport de Cl^- est la cause de la mucoviscidose. Le transporteur CFTR a aussi ceci de particulier : il ne s'ouvre que s'il dispose de l'énergie de l'ATP et a subi une phosphorylation dépendant de l'AMPc ; on ignore encore la base structurale qui fait de CFTR un tunnel ionique asservi.

Transport actif mû par un gradient d'ions

Les pompes ioniques et les transporteurs ABC décrits dans la section précédente utilisent directement l'énergie de l'ATP pour transporter des molécules contre leur gradient électrochimique. D'autres molécules remontent leur gradient de concentration en utilisant non l'énergie de l'ATP, mais celle dérivée du transport couplé d'une autre molécule dans le sens thermodynamiquement favorisé. Le gradient de Na^+ généré par la pompe à Na^+-K^+ fournit une source d'énergie utilisée souvent par les cellules de mammifère pour transporter activement des sucres, des acides aminés et des ions. Le gradient de H^+ constitué par les pompes à H^+ des bactéries, levures et cellules végétales joue le même rôle.

Les cellules épithéliales bordant la lumière du tube digestif fournissent un bel exemple de transport actif entraîné par le gradient de Na^+ ; ces cellules emploient les systèmes de transport actif du pôle apical de leur membrane plasmique pour importer les sucres et les acides aminés des aliments contenus dans le bol alimentaire. Ainsi, l'absorption de glucose s'effectue sur un transporteur qui transfère en même temps deux ions Na^+ et une molécule de glucose dans la cellule (figure 12.31). Le flux d'ions Na^+ selon leur gradient électrochimique fournit l'énergie requise pour que la cellule importe le glucose alimentaire et en accumule de hautes concentrations. Ce glucose suit alors son gradient de concentration, *via* un transport par diffusion facilitée qui l'excrète dans le tissu conjonctif (traversé par les capillaires sanguins) jouxtant la face basolatérale des cellules épithéliales (figure 12.32). La



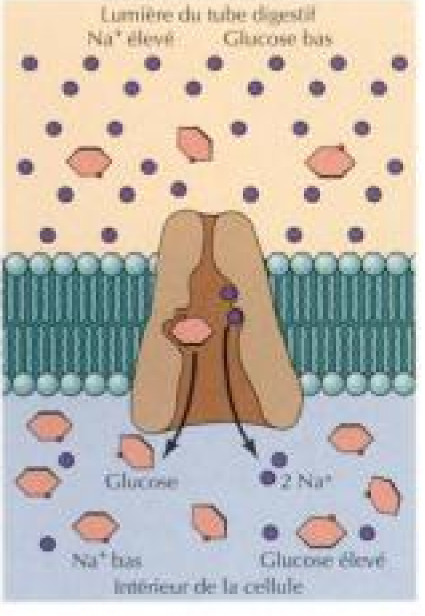
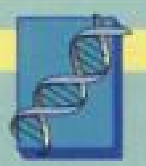


Figure 12.31
Transport actif de glucose. Un transport actif entraîné par le gradient de Na^+ sert à importer le glucose de la lumière du tube digestif. Le transporteur capture et transporte de concert deux ions Na^+ et une molécule de glucose dans la cellule ; suivant le sens thermodynamique, le flux entrant de Na^+ entraîne le flux de glucose contre son gradient concentration.

MÉDECINE MOLÉCULAIRE



La mucoviscidose

La maladie

La mucoviscidose (*cystic fibrosis*, en anglais) est une affection congénitale récessive frappant les enfants et les jeunes adultes ; c'est la plus courante des maladies congénitales létales chez les populations caucasiennes puisqu'elle atteint un nouveau-né sur 2 500, mais elle est rare dans les autres races. Dans la mucoviscidose, le dérèglement principal est la sécrétion d'un mucus abondant et visqueux par divers types de cellules épithéliales, notamment celles qui bordent les voies respiratoires et le tube digestif. La maladie se révèle par des troubles respiratoires dus à l'obstruction des voies respiratoires par d'épais bouchons de mucus, suivie par l'apparition d'infections bactériennes à répétition. Beaucoup de patients présentent en plus des troubles pancréatiques, car les canaux pancréatiques se remplissent de mucus. On observe aussi une anomalie des glandes sudoripares ; d'ailleurs l'hypersalinité de la sueur est un signe diagnostique de la maladie. On soigne à présent cette affection par une physiothérapie qui améliore le drainage des bronches, par l'administration d'antibiotiques et par un apport d'enzymes pancréatiques de substitution. Si ces traitements permettent à nombre de patients de survivre jusqu'à l'âge de 30 ans, la mucoviscidose est toujours fatale, par atteinte pulmonaire dans 95 % des cas.

Bases moléculaire et cellulaire

Le nœud de la mucoviscidose est un défaut de transport de l'ion Cl^- par les épithéliums atteints, notamment celui des glandes sudoripares et celui des voies respiratoires. En 1984, on démontra que les tunnels à Cl^- fonctionnent de façon anormale dans les cellules épithéliales des patients atteints de mucoviscidose. On révéla la base moléculaire de l'affection en 1989, lors du clonage du gène de la mucoviscidose. La séquence du gène montrait que le gène code une protéine appelée CFTR (pour cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) appartenant à la famille des transporteurs ABC. Plusieurs autres travaux indiquèrent que CFTR sert de tunnel à Cl^- et que la mutation congénitale causant la mucoviscidose est directement liée à un transport de Cl^- déficient.

Prévention et traitement

Comme pour les autres affections congénitales, l'isolement du gène de la mucoviscidose a rendu possible un criblage génétique capable d'identifier les individus porteurs d'allèles mutants. Dans certaines populations, la fréquence d'individus hétérozygotes atteint un individu sur 25, suggérant l'opportunité de procéder à un criblage général de la population, pour identifier les couples à risque et les envoyer chez un conseiller en génétique. En outre, le fait de savoir que CFTR fonctionne comme un tunnel à Cl^- a suggéré de nouvelles approches thérapeutiques ; l'une d'entre elles est d'utiliser des médicaments qui stimulent l'ouverture d'autres tunnels à Cl^- dans les épithélium touchés. En cas d'échec, on pourrait, par thérapie génique, introduire des gènes CFTR normaux dans l'épithélium des voies respiratoires des sujets atteints de mucoviscidose.

Le succès de pareille thérapie génique fut confirmé au cours d'expériences montrant que l'introduction du gène *cftr* normal dans des cultures de cellules de patients souffrant de mucoviscidose suffit à rétablir un fonctionnement adéquat des tunnels à Cl^-. Il semble qu'on puisse appliquer cette méthode en clinique, vu l'accessibilité des cellules de l'épithélium bronchique aux systèmes d'aérosol à présent disponibles. L'expérimentation sur l'animal a montré que des vecteurs viraux peuvent transmettre l'ADNc de CFTR à l'épithélium des voies respiratoires ; en 1993, on a entrepris un traitement pilote par thérapie génique de la mucoviscidose ; ces études en cours montrent qu'il est possible de transférer l'ADNc de CFTR aux cellules épithéliales des voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose, encourageant les cliniciens à mettre au point un protocole de thérapie génique efficace.

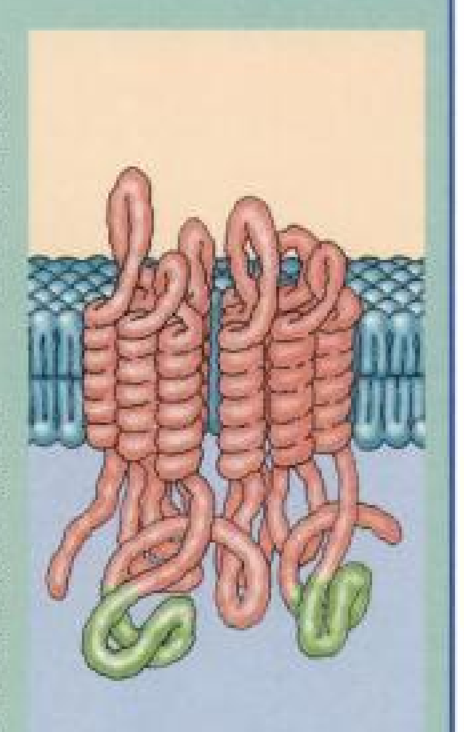


Schéma du régulateur transmembranaire des tunnels conducteurs déficients dans la mucoviscidose (CFTR).

Références

Collins, F. S. 1992. Cystic fibrosis : Molecular biology and therapeutic implications. *Science* **256** :774-779.

Korst, R. J. *et al.* 1995. Gene therapy for the respiratory manifestations of cystic fibrosis. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* **151** :S75-S87.

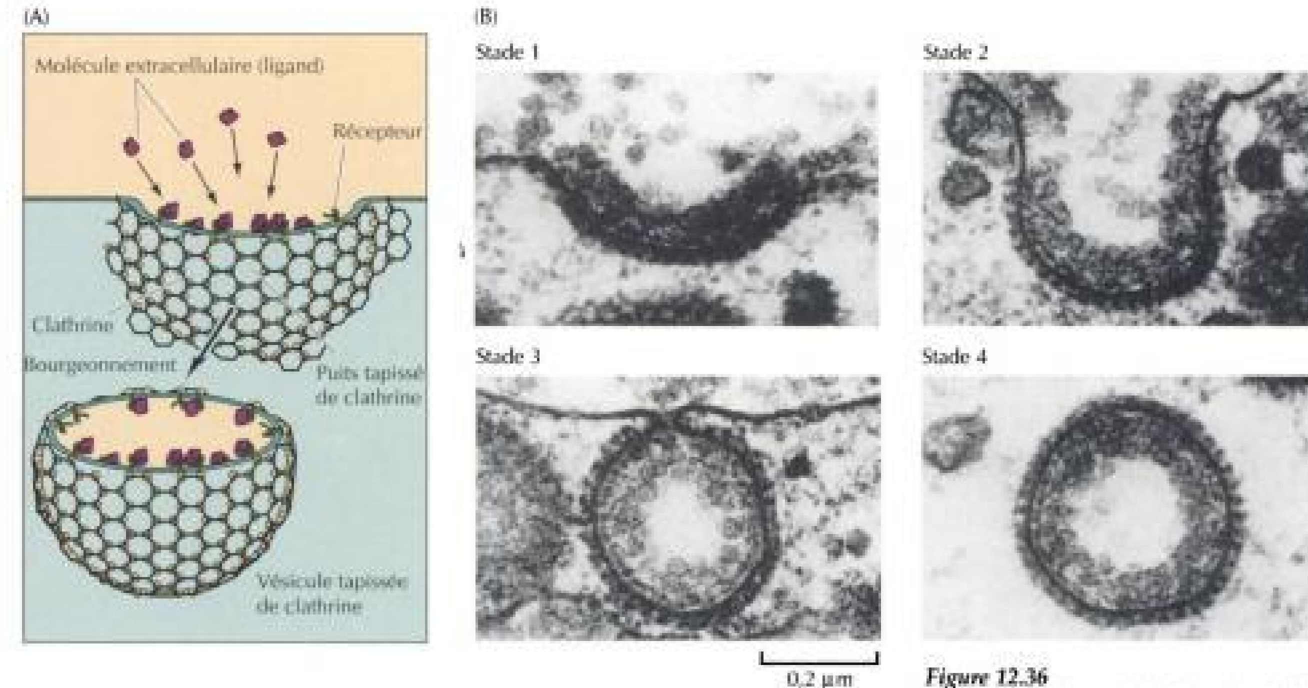


Figure 12.36
Formation d'une vésicule tapissée de clathrine. (A) Des molécules du milieu (les ligands) se fixent à des récepteurs siégeant sur la cellule et concentrés dans des puits tapissés de clathrine. Ceux-ci bourgeonnent de la face interne de la membrane plasmique en formant des vésicules intracellulaires couvertes de clathrine. (B) Micrographie électronique

de service » ; en éliminant les microbes de l'organisme, les macrophages et les neutrophiles sont essentiels à la défense de l'organisme ; en outre, les macrophages débarrassent tous les tissus des cellules vieillissantes ou mortes. Un exemple frappant de ce rôle chez l'Homme est celui des macrophages de la rate et du foie, qui se chargent d'éliminer par jour jusqu'à 10^{11} cellules sanguines périmées.

Endocytose par récepteur interposé

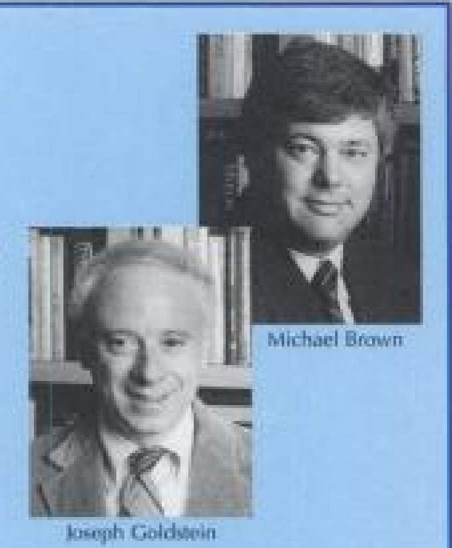
Contrairement à la phagocytos
pinocytose est courante chez

Le récepteur de LDL (suite)

cholestérol soit produit en excès. D'autres expériences prouvèrent que les LDL qui s'étaient fixées aux fibroblastes se trouvaient dans la fraction membranaire des extraits cellulaires, suggérant que le récepteur de LDL était une protéine de surface.

Portée de la découverte

Après avoir identifié le récepteur de LDL, Brown et Goldstein montrèrent que les LDL fixées à la surface cellulaire étaient rapidement ingurgitées et démembrées en cholestérol libre au sein des lysosomes. En collaboration avec Richard Anderson, ils prouvèrent alors que le récepteur de LDL est englouti par endocytose au niveau de puits tapissés. En outre, leurs premières expériences avaient montré que le récepteur de LDL est recyclé vers la membrane plasmique après avoir été dépouillé de son ligand dans la cellule. Des expériences destinées à saisir la régulation de la biosynthèse du cholestérol servirent donc à élucider la voie maîtresse que la cellule eucaryote utilise pour engloutir des macromolécules de nature singulière, exemple notoire des détours inattendus imposés à la science et aux chercheurs pour explorer de nouveaux et passionnants domaines.



Michael Brown

Joseph Goldstein

dans les puits tapissés de clathrine de la surface cellulaire, puis internalisé par endocytose ; comme la section suivante le montrera, le récepteur est ensuite recyclé vers la membrane plasmique tandis que la LDL est transférée au lysosome, où son cholestérol est libéré pour les besoins de la cellule.

L'élucidation de ce processus est due à l'étude de patients souffrant d'une maladie congénitale appelée hypercholestérolémie familiale. Ces patients ont un taux de cholestérol sérique très élevé et souffrent d'accidents cardiaques dans leur jeune âge. Brown et Goldstein découvrirent que les cellules de ces malades sont incapables de capturer les LDL du milieu de culture, ce qui explique l'accumulation du cholestérol dans le sang de ces patients. D'autres expériences montrèrent d'une part que les cellules humaines normales portent des récepteurs de LDL, concentrés dans les puits tapissés, d'autre part que l'hypercholestérolémie familiale est due à des mutations congénitales du récepteur de LDL. Ces mutations sont de deux sortes : dans le premier type, les LDL ne vont même pas s'attacher aux cellules de la plupart des patients souffrant d'hypercholestérolémie familiale, une preuve que la capture des LDL n'a pas lieu en l'absence de récepteurs spécifiques à la surface cellulaire ; dans l'autre type de mutation, on a trouvé des malades dont les cellules capturaient les LDL, mais ne pouvaient pas les incorporer ; chez ces patients, les récepteurs de LDL ne se rassemblaient pas dans les puits tapissés, montrant directement le rôle central des puits tapissés dans l'endocytose par récepteur interposé.

Les mutations empêchant le récepteur de LDL de gagner le puits tapissé siègent dans la queue cytoplasmique du récepteur et ne consistent parfois qu'en la substitution d'une cystéine à la place d'une tyrosine (figure 12.38). D'autres études ont identifié le signal d'internalisation du récepteur de LDL à une séquence de six acides aminés, dont une tyrosine cruciale. On a retrouvé le même type de signal d'internalisation, souvent pourvu d'un résidu tyrosine, dans la queue cytoplasmique d'autres récepteurs ingérés *via* un puits tapissé. Ces signaux d'internalisation s'attachent à des adaptines, qui, à leur tour, se fixent à la clathrine, sur la face cytosolique de la membrane (figure 12.39), à la façon dont les vésicules tapissées de clathrine se forment lors du transfert des hydrolases lysosomiales issues du réseau du *trans*-Golgi (voir figure 9.30). La clathrine s'organise en une structure en panier, qui déforme la membrane en y creusant des puits ; autour du col de ces puits invaginés, les molécules d'une autre protéine, la dynamine, s'assemblent en un anneau qui va se rétrécir pour faire tomber la vésicule dans le cytoplasme.

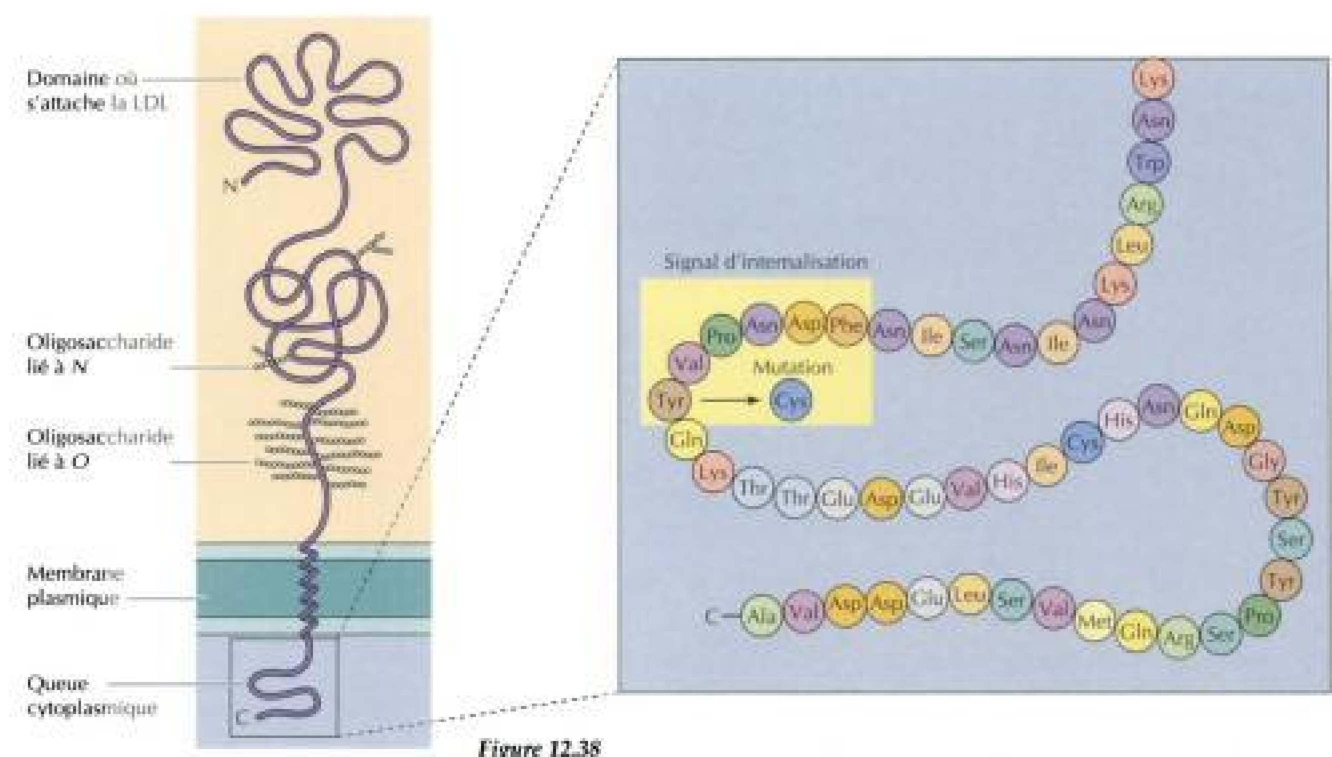
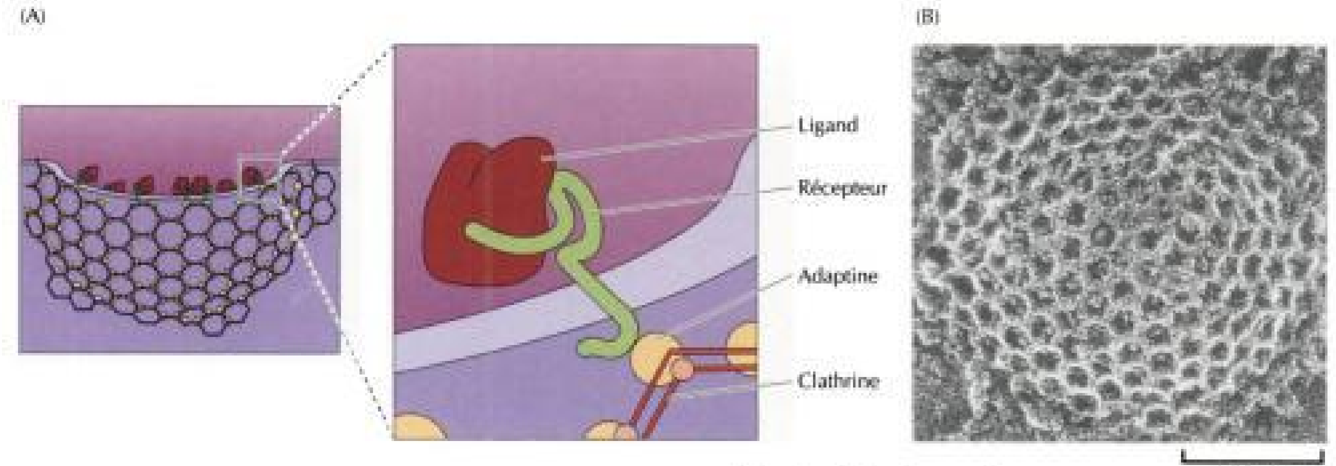


Figure 12.38
Structure du récepteur de LDL. Le récepteur de LDL comporte 700 résidus d'acide aminé extracellulaires, une hélice α transmembranaire de 22 résidus et une queue cytoplasmique de 50 résidus d'acide aminé. La portion N-terminale de 292 résidus constitue le domaine séquestrant la particule LDL. Six résidus de la queue cytoplasmique définissent le signal d'internalisation, découvert par le fait que les mutations de Tyr en Cys empêchaient les récepteurs d'aller s'assembler dans les puits tapissés.

Dans la cellule d'eucaryote, l'endocytose par récepteur interposé est une activité primordiale de la membrane plasmique ; on y a trouvé plus d'une vingtaine de récepteurs différents qui étaient sélectivement internalisés par cette voie. Comme les fluides extracellulaires entrent aussi dans la cellule par le truchement de vésicules tapissées nées de la membrane plasmique, l'endocytose par récepteurs interposés résulte non seulement en une prise sélective de macromolécules, mais aussi en une ingestion en bloc de fluides

Figure 12.39
Formation d'un puits tapissé de clathrine. (A) Des adaptateurs protéiques (adaptines) s'attachent à la fois à la clathrine et au signal d'internalisation porté par la queue cytoplasmique du récepteur. (B) Micrographie électronique d'un puits tapissé de clathrine, montrant la structure en panier du réseau de clathrine. (B, cliché dû à l'obligeance de John E. Heuser, Washington University School of Medicine)



extracellulaires et de leurs composants (**pinocytose de phase liquide**). Les puits tapissés occupent classiquement 1 à 2 % de la surface d'une membrane plasmique et on estime qu'ils y restent de 1 à 2 minutes ; ces valeurs permettent de calculer que l'endocytose par récepteur interposé introduit dans le cytoplasme une quantité de surface cellulaire équivalente à la surface entière de la membrane plasmique toutes les 2 heures.

D'autres travaux ont montré que la cellule possède encore d'autres voies d'endocytose, indépendantes de la clathrine. Ainsi, les fluides et certaines molécules fixées à la membrane continuent d'être endocytés dans des conditions expérimentales qui inhibent l'endocytose au moyen des puits tapissés de clathrine ; le mécanisme de ce processus n'est pas connu. On pense que cette endocytose indépendante de la clathrine passe par de minuscules invaginations de la membrane plasmique (50 à 80 nm de diamètre) appelées **alvéoles** (figure 12.40) ; celles-ci portent une autre protéine, la cavéoline, et on leur attribue divers processus de transport, dont l'endocytose, mais on n'a pas prouvé que leur bourgeonnement produit des vésicules d'endocytose. D'autre part, on a décrit de plus volumineuses vésicules non tapissées de clathrine (d'environ 95 nm de diamètre), mais leur origine n'est pas claire. On sait en outre qu'un processus appelé **macropinocytose** fait intervenir de grandes vésicules (de 0,15 à 5 µm de diamètre) pour ingurgiter les liquides. S'il reste à définir plusieurs mécanismes indépendants de la clathrine, c'est l'endocytose par clathine interposée qui est la voie principale pour incorporer les fluides du milieu intérieur et les macromolécules particulières.

Va-et-vient des protéines dans l'endocytose

Dès qu'elle parvient dans la cellule, la vésicule couverte de clathrine se débarrasse de son manteau et fusionne avec un **endosome**, qui est une vésicule de la périphérie cellulaire pourvue de prolongements tubulaires. La spécificité de la fusion d'une vésicule d'endocytose avec un endosome dépend (comme nous l'avons vu au chapitre 9) d'interactions entre paires complémentaires de protéines transmembranaires appartenant à la vésicule et aux membranes cibles (v-SNARE et t-SNARE) et par des protéines Rab séquestrant GTP. L'endosome précoce sert de compartiment de tri ; les molécules gagnées par endocytose y sont soit recyclées vers la membrane plasmique soit transférées au lysosome pour y être détruites. En outre, les endosomes précoces des cellules polarisées transfèrent facilement des protéines d'un domaine à l'autre de la membrane plasmique, par exemple, entre le domaine apical et le domaine basolatéral d'une cellule épithéliale.

Une faculté importante des endosomes précoces est de générer en leur sein un pH acide (d'environ 6,0 à 6,2), grâce à une pompe membranaire à H^+. Ce pH acide provoque la dissociation de nombreux ligands d'avec leur récepteur au sein de l'endosome précoce ; ce découplage permet au récepteur et au ligand de suivre chacun leur destinée dans la cellule. Un exemple classique est celui de la LDL, qui quitte son récepteur au sein de l'endoso-



Figure 12.40
Alvéoles. Micrographie électronique d'un fibroblaste humain avec une membrane plasmique couverte d'alvéoles. (Cliché aimablement transmis par R. G. W. Anderson/University of Texas Southwestern Medical School-Dallas).

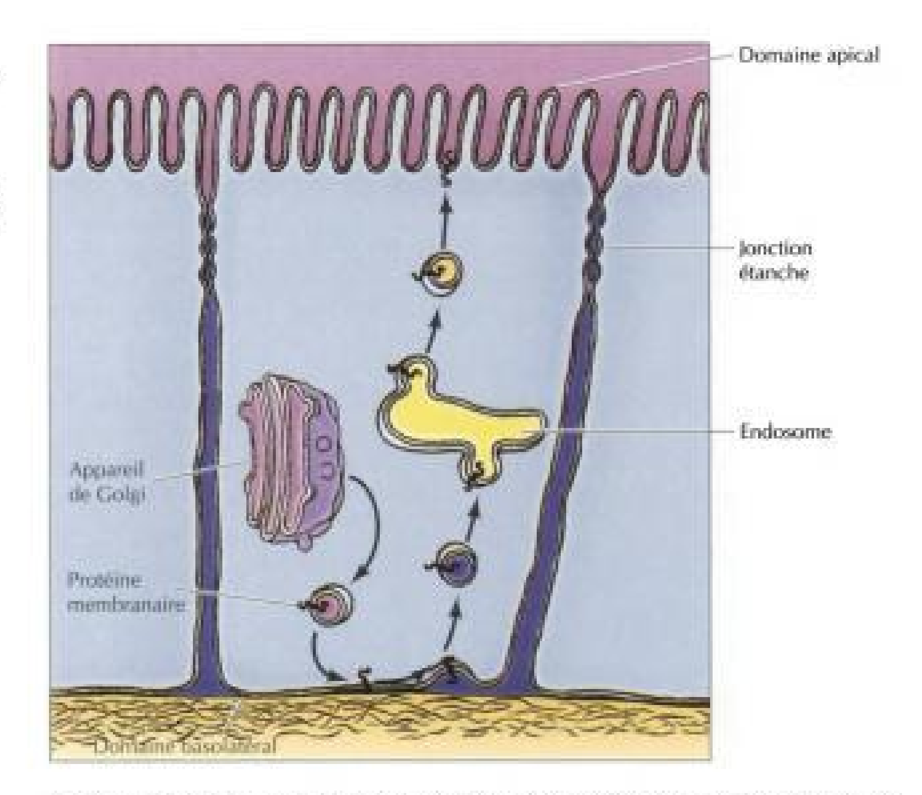


Figure 12.43
Tri de protéines par transcytose. Une protéine destinée au pôle apical de la membrane plasmique est d'abord transférée de l'appareil de Golgi au domaine basolatéral de la membrane ; elle est ensuite endocytée et transférée sélectivement au domaine apical par un endosome précoce.

brane plasmique peut-il être envoyé dans un endosome précoce avant de gagner la membrane apicale ; dans certaines cellules, ce mécanism

de de coloration de Gram, inventée par Christian Gram en 1884 (figure 12.44) ; comme on l'a indiqué au début du chapitre, les bactéries Gram négatives (comme *E. coli*) possèdent un système membranaire dédoublé, dans lequel la membrane plasmique est recouverte d'une autre membrane, perméable ; ces bactéries possèdent une paroi cellulaire mince, logée entre les deux membranes. Les bactéries Gram positives (tel le pathogène humain ubiquitaire *Staphylococcus aureus*) sont bordées seulement de leur membrane plasmique, enveloppée dans une paroi cellulaire beaucoup plus épaisse que celle des bactéries Gram négatives.

Malgré ces différences de structure, le principal constituant des cellules bactériennes tant Gram positives que Gram négatives est un **peptidoglycane** (figure 12.45) ; cette molécule est formée de chaînes polysaccharidiques

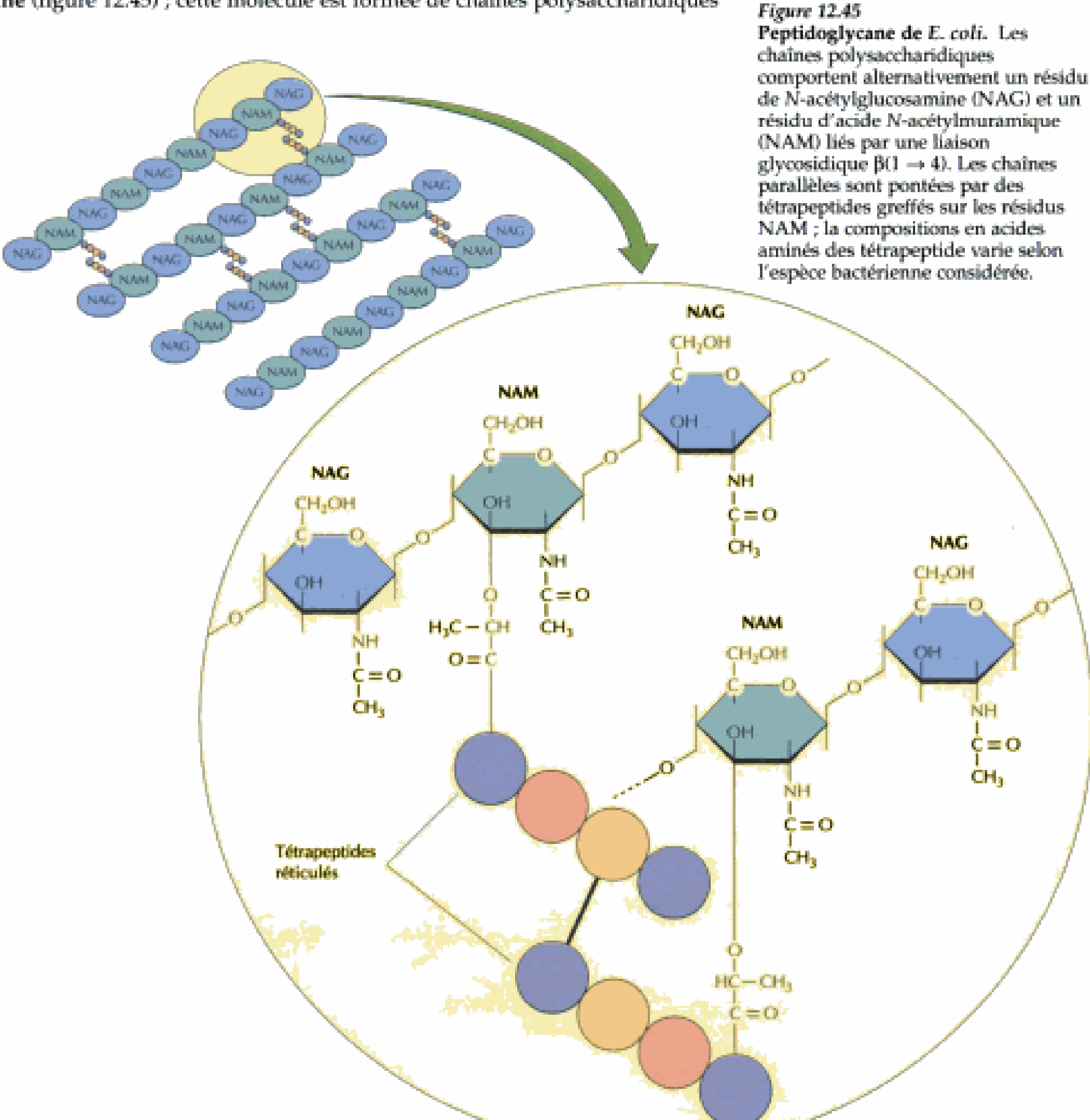


Figure 12.45
Peptidoglycane de *E. coli*. Les chaînes polysaccharidiques comportent alternativement un résidu de *N*-acétylglucosamine (NAG) et un résidu d'acide *N*-acétylmuramique (NAM) liés par une liaison glycosidique β(1 → 4). Les chaînes parallèles sont pontées par des tétrapeptides greffés sur les résidus NAM ; la compositions en acides aminés des tétrapeptide varie selon l'espèce bactérienne considérée.

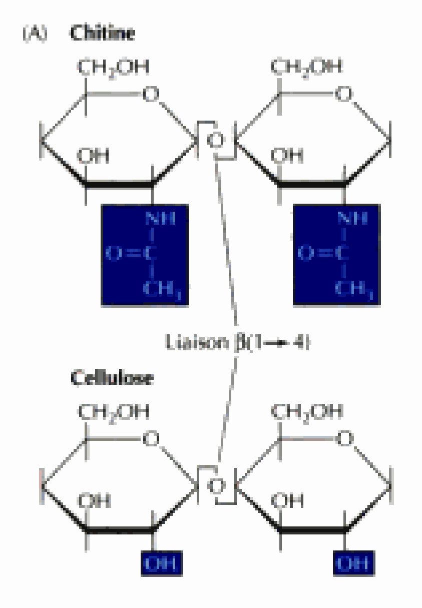
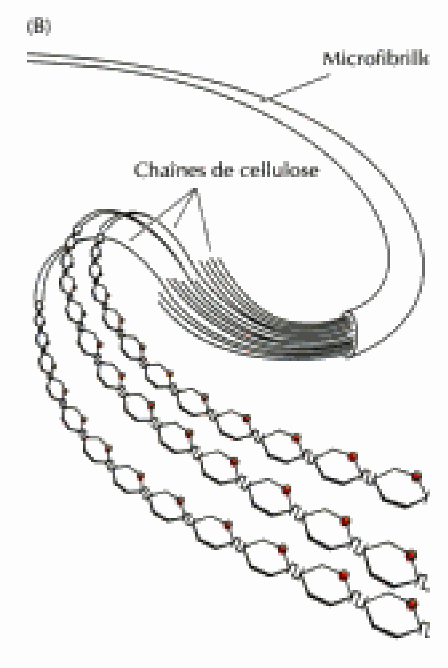


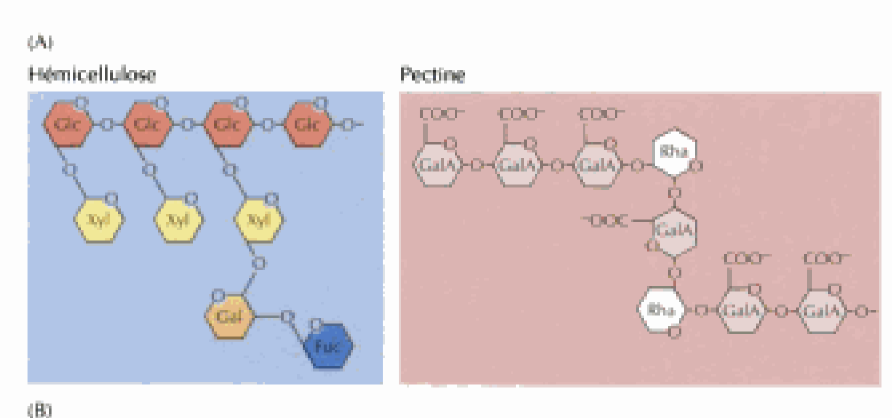
Figure 12.46
Polysaccharides des parois des champignons et des plantes. (A) La chitine (polysaccharide prépondérant de la paroi des champignon) est un polymère non ramifié de résidus *N*-acétylglucosamine, la cellulose est un polymère non ramifié de résidus glucose. Les monomères glucidiques y sont joints par des liaisons β(1 → 4), ce qui permet la formation de longues chaînes rigides. (B) Les chaînes de cellulose s'assemblent parallèlement en microfibrilles.



linéaires pontées par de courts peptides ; ce pontage covalentiel fait que le peptidoglycane constitue une coque résistante tout autour de la cellule bactérienne. Notons ici que la structure singulière de leur paroi rend les bactéries sensibles à certains antibiotiques ; la pénicilline, par exemple, en inhibant l'enzyme qui synthétise les ponts entre les différents brins de peptidoglycane, interfère avec la synthèse de la paroi cellulaire et arrête la prolifération de la cellule bactérienne.

Paroi des cellules végétales

Contrairement à celle des bactéries, la paroi cellulaire des eucaryotes (tels que les champignons, les algues et les plantes supérieures) est surtout composée de polysaccharides (figure 12.46). Le polysaccharide structural majeur des cellules de champignons est la **chitine** (un polymère de résidus *N*-acétylglucosamine), qui compose aussi l'exosquelette des arthropodes (la carapace du crabe, par exemple). La paroi cellulaire de la plupart des algues et des plantes supérieures se compose principalement de **cellulose**, qui est à elle seule le polymère prépondérant de la biosphère. La cellulose est un polymère non branché d'au moins 10 000 résidus glucosyle, unis par des liaisons β(1 → 4) qui maintiennent le polysaccharide sous forme de longue chaîne étirée ; quelques dizaines de ces chaînes s'associent alors en parallèle en formant des **microfibrilles cellulosiques**, qui atteignent une longueur de plusieurs micromètres.



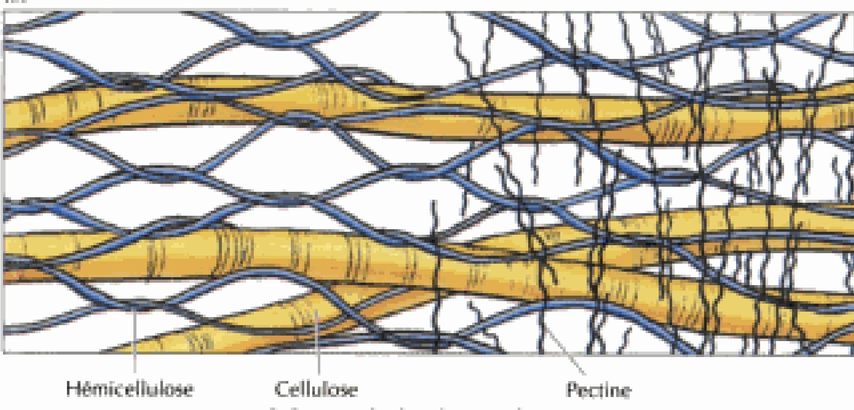
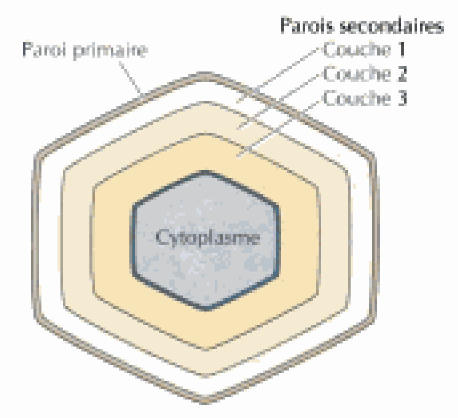
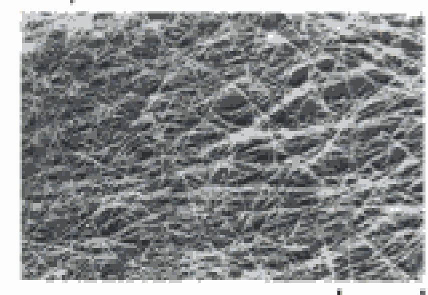


Figure 12.47
Schéma d'une paroi de cellule végétale. (A) Structure générale d'une hémicellulose (xyloglucane) et d'une pectine (rhamnogalacturonane). Un xyloglucane comprend un squelette de résidus glucose (Glc) sur lequel se greffent des résidus xylose (Xyl), galactose (Gal) et fucose (Fuc). Le squelette d'un rhamnogalacturonane est formé de résidus de galacturonate (GalA) et de rhamnose (Rha), auxquels sont attachés divers types de chaînes latérales. (B) Les hémicelluloses s'attachent aux microfibrilles de cellulose en formant un réseau fibreux noyé dans une matrice gélatineuse de pectines.





Paroi secondaire

0,2 µm

Figure 12.48
Parois cellulaires primaire et secondaire. La paroi cellulaire secondaire se dépose entre la paroi primaire et la membrane plasmique. Les parois secondaires sont souvent constituées de trois couches, où l'orientation des microfibrilles cellulosiques diffère. Les micrographies électroniques montrent les microfibrilles cellulosiques d'une paroi primaire et d'une paroi secondaire. (Cliché de paroi primaire dû à l'amabilité de F. C. Steward ; celle de la paroi secondaire à l'amabilité de Biophoto Associates/PhotoResearchers Inc).

Au sein de la paroi cellulaire, les microfibrilles cellulosiques sont noyées dans une matrice de protéines et de deux autres types de polysaccharides, des **hémicelluloses** et des **pectines** (figure 12.47). Les hémicelluloses sont des polysaccharides richement ramifiés, attachés par des liaisons hydrogène à la surface des microfibrilles de cellulose ; ceci réticule les microfibrilles de cellulose en un réseau de molécules fibreuses solides, dont dépend la résistance mécanique de la paroi des cellules végétales. Les pectines sont des polysaccharides ramifiés comportant une grande proportion de résidus galacturonate de charge négative ; à cause de ces nombreuses charges négatives, les pectines séquestrent des cations (tels Ca^{2+}) et emprisonnent des molécules d'eau, en donnant un gel ; cette faculté de former un gel est illustrée par le fait qu'on prépare les confitures et les gelées en ajoutant de la pectine au jus des fruits. Dans la paroi cellulaire, les pectines constituent un réseau de nature gélatineuse dans lequel baignent les microfibrilles cellulosiques réticulées. En outre, les parois cellulaires comportent tout une variété de glycoprotéines, incorporées à la matrice et servant à la consolider.

La structure et le rôle de la paroi cellulaire évolue avec la taille de la cellule végétale. La paroi d'une jeune cellule (**paroi cellulaire primaire**) est relativement mince et ductile, ce qui permet son expansion ; dès que cette dernière s'arrête, beaucoup de cellules déposent des **parois cellulaires secondaires** entre la membrane plasmique et la paroi primaire (figure 12.48). Par leur épaisseur et leur rigidité accrue, ces parois cellulaires secondaires sont primordiales dans les types cellulaires responsables du transfert d'eau à travers la plante et de la résistance mécanique de la plante.

Paroi primaire et parois secondaires diffèrent tant par la composition que par l'épaisseur. La paroi primaire contient des quantités à peu près égales de cellulose, d'hémicellulose et de pectines ; par contre, les parois secondaires, bien plus rigides, sont en général dépourvues de pectine et contiennent de 50 à 80 % de cellulose ; beaucoup de ces parois sont en outre renforcées par de la **lignine**, un polymère complexe fait de résidus phénoliques, qui donne au bois sa résistance et sa densité. Par leur orientation, les microfibrilles cellulosiques d'une paroi primaire diffèrent de celles des parois secondaires ; celles de la paroi primaire sont disposées au hasard, mais celles des parois secondaires sont bien arrangées (voir figure 12.48). Les parois secondaires se déposent habituellement en couches dont les microfibrilles ont une orientation particulière, formant une structure lamellée de très grande résistance mécanique.

Un des rôles primordiaux de la paroi cellulaire végétale est de s'opposer au gonflement de la cellule sous l'effet de la pression osmotique. Contrairement à la cellule animale, la cellule végétale n'équilibre pas la pression osmotique de son cytosol avec celle du milieu extracellulaire ; aussi, cette pression osmotique entretient-elle un flux d'eau entrant dans la cellule. La cellule végétale le tolère parce que sa paroi cellulaire rigide s'oppose au gonflement et à l'éclatement de la cellule, mais en laissant sa pression hydrostatique interne (**pression de turgescence**) croître jusqu'à compenser la pression osmotique et arrêter le flux d'eau entrant.

Comme le prouve l'aspect d'une plante déshydratée, fanée, la pression de turgescence rend compte en grande partie de la rigidité des tissus végétaux. En outre, cette pression de turgescence est essentielle à un type de croissance cellulaire particulier aux plantes. En effet, la plupart des plantes

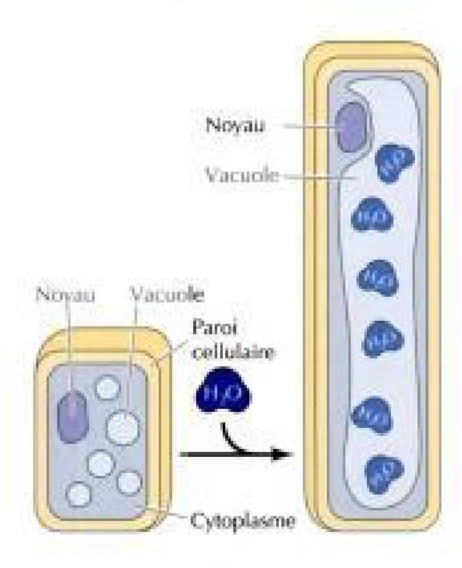


Figure 12.49
Croissance d'une cellule végétale. La pression de turgescence allonge la cellule en y attirant l'eau, qui va s'accumuler dans une grande vacuole centrale.

grandissent en absorbant de l'eau, sans faire la synthèse de nouveaux composants cytoplasmiques (figure 12.49). Le moteur de ce mécanisme de croissance est un type d'hormones végétales (les **auxines**) qui amollissent une région de la paroi cellulaire que la pression de turgescence va pousser en avant avec tout le cytoplasme cellulaire ; pendant ce processus, le flux d'eau entrant fait grossir une grande vacuole centrale, de sorte que la cellule grandit sans augmenter le volume de son cytosol ; ce mode de croissance explique qu'une cellule végétale grandisse de 10 à 100 fois au cours de sa vie.

Pendant que la cellule grandit, elle synthétise de nouveaux composants à l'extérieur de sa membrane plasmique. Les constituants de la matrice, dont les hémicelluloses et les pectines, sont synthétisés dans le Golgi, puis excrétés, mais la cellulose est formée par un complexe enzymatique membranaire (la **cellulose synthase**) ; dans une cellule en train de croître, les microfibrilles cellulosiques néoformées se déposent dans une direction perpendiculaire à la direction dans laquelle la cellule grandit (il semble que cette direction soit cruciale pour fixer le sens dans lequel la cellule va grandir)(figure 12.50). Remarquons que les microfibrilles cellulosiques d'une paroi en expansion se déposent parallèlement aux microtubules corticaux soutenant la membrane plasmique ; ces microtubules détermineraient l'orientation des microfibrilles cellulosiques néoformées en fixant le sens dans lequel les complexes enzymatiques de la cellulose synthase se déplacent au sein de la membrane. Ce sont donc les microtubules corticaux qui fixent le sens d'expansion de la paroi, qui, lui, détermine le sens de croissance de la cellule, et en fin de compte, donne sa forme définitive à la plante adulte.

Matrice extracellulaire

La cellule animale est dépourvue de paroi, mais souvent, dans les tissus des organismes pluricellulaires, est emprisonnée dans une **matrice extracellulaire** constituée de protéines et de polysaccharides sécrétés ; cette matrice remplit les espaces intercellulaires et unit les cellules et les tissus les uns aux

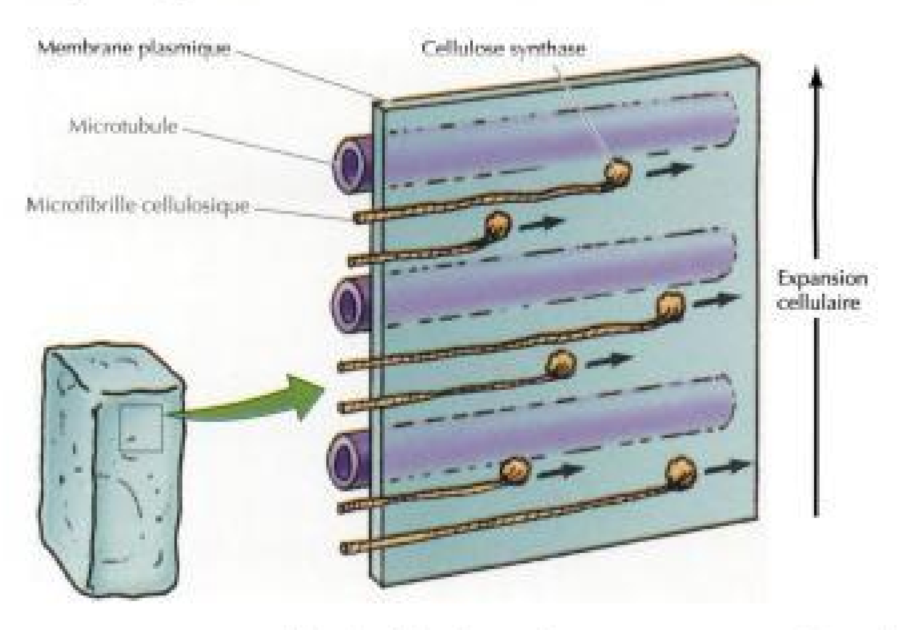


Figure 12.50
Synthèse de cellulose au cours de la croissance cellulaire. Les microfibrilles cellulosiques synthétisées par un complexe enzymatique inclus dans la membrane plasmique (la cellulose synthase) se forment perpendiculairement à la direction dans laquelle la cellule va grandir ; le sens de la synthèse de microfibrilles suit la direction des microtubules siégeant sous la membrane plasmique.

autres. Parmi les types de matrice extracellulaire, citons les minces **lames basales**, feuilletées, qui soutiennent les couches de cellules épithéliales (figure 12.51) ; elles entourent aussi les cellules du muscle, du tissu adipeux et des nerfs périphériques. Cependant, la matrice extracellulaire est prépondérante dans les tissus conjonctifs, notamment dans le tissu conjonctif lâche sous-jacent aux épithélium, tissu constitué principalement de matrice extracellulaire abritant des fibroblastes. D'autres types de tissu conjonctif, comme l'os, le tendon et le cartilage, consistent surtout en une matrice extracellulaire, à laquelle ils doivent leur structure et leur rôle.

Les diverses matrices extracellulaires comportent des fibres protéiques résistantes noyées dans une substance fondamentale gélatineuse de nature polysaccharidique, une constitution qui n'est pas sans rappeler celle des parois végétales. Outre ses protéines fibreuses et ses polysaccharides, une matrice extracellulaire contient des protéines d'adhérence qui unissent les composants de la matrice les uns aux autres et aux cellules hôtes ; les diverses matrices extracellulaires se singularisent par les variantes de ce schéma général. Ainsi, le tendon est constitué presque uniquement de protéines fibreuses, tandis que le cartilage est riche en polysaccharides formant un gel très résistant à la compression. Dans l'os, la matrice extracellulaire est rendue rigide par l'inclusion de cristaux de phosphate calcique. La structure feuilletée des lames basales est due, elle, à la présence de composants différents de ceux qu'on trouve habituellement dans les tissus conjonctifs.

La principale protéine de structure de la matrice extracellulaire est le **collagène**, la protéine prépondérante des tissus animaux. Les collagènes appartiennent à une grande famille de protéines, dont on connaît 19 membres. Ces protéines se caractérisent par la formation d'une hélice triple, dans laquelle les chaînes polypeptidiques s'enroulent les unes autour des autres comme les brins d'une corde (figure 12.52). Le domaine en triple hélice des collagènes consiste en répétitions de séquences d'acides aminés -G-X-Y- ; il faut, de trois en trois positions, une glycine (le plus petit résidu, puisque sa chaîne latérale comporte une seulement un atome d'hydrogène) de façon que les trois chaînes polypeptidiques se serrent suffisamment pour former la triple hélice de collagène ; on trouve souvent une proline à la position X et une hydroxyproline à la position Y ; grâce à leur structure cyclique, ces résidus stabilisent la conformation hélicoïdale des chaînes polypeptidiques. Le sin-

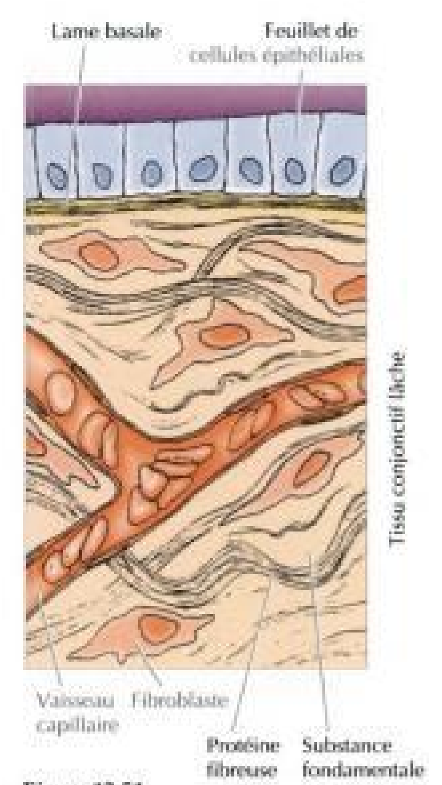


Figure 12.51
Matrice extracellulaire typique. Un feuillet de cellules épithéliales s'appuie sur une mince couche de matrice extracellulaire appelée lame basale. Sous la lame basale se trouve du tissu conjonctif lâche qui consiste principalement en matrice extracellulaire sécrétée par les fibroblastes ; cette matrice comprend des protéines fibreuses de soutien, incluses dans une substance fondamentale gélatineuse constituée de polysaccharides.

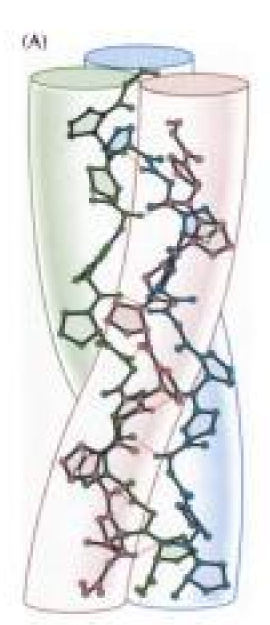
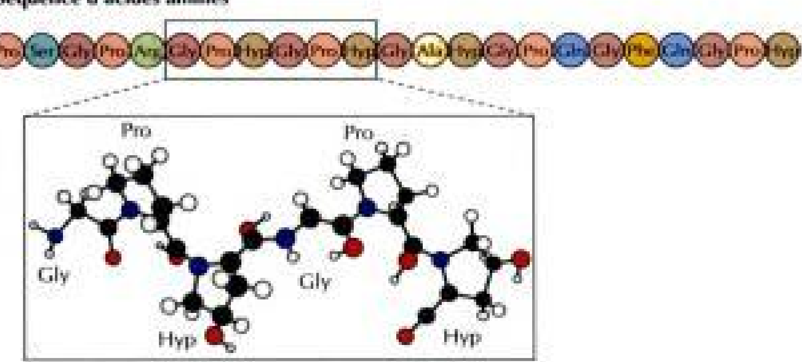


Figure 12.52
Structure du collagène . (A) Trois chaînes polypeptidiques torsadées en hélice triple typique. (B) La séquence d'acides aminés du domaine en hélice triple d'un collagène est constituée de répétitions -Gly-X-Y-, où X est souvent une proline et Y souvent une hydroxyproline (Hyp).



Proline

Prolyl hydroxylase

Hydroxyproline

Figure 12.53
Origine de l'h

Table 12.2 Membres représentatifs de la famille des collagènes

Classe de collagène	Types	Localisation tissulaire
Formant des fibrilles	I	La plupart des tissus conjonctifs
	II	Cartilage et humeur vitreuse
	III	Tissu conjonctif élastique (peau, poumon, etc.)
	V	Tissus riches en collagène I
	XI	Tissus riches en collagène II
Associé aux fibrilles	IX	Tissus riches en collagène II
	XII	Tissus riches en collagène I
	XIV	Tissus riches en collagène I
	XVI	Nombreux tissus
Formant réseau	IV	Lames basales
Filaments d'ancrage	VII	Unions des lames basales au tissu conjonctif sous-jacent

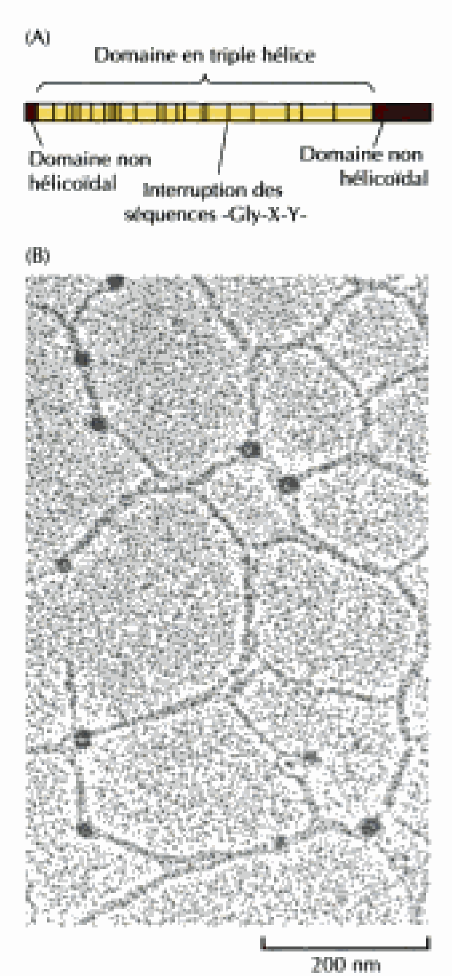


Figure 12.55
Collagène de type IV. (A) Dans le collagène de type IV, les répétitions -Gly-X-Y- sont interrompues par de nombreuses séquences non hélicoïdales (traits). (B) Micrographie électronique d'un réseau de collagène de type IV (B. P. D. Yurchenco et J. C. Schittny, 1990, *FASEB J.* **4** :1577).

cimentent ces fibrilles les unes aux autres et aux autres constituants de la matrice. Les lames basales se forment à partir d'un autre type de collagène, le collagène IV, qui se dépose en un réseau (figure 12.55). Les éléments -Gly-X-Y- de ce collagène sont fréquemment interrompus par de courtes séquences non hélicoïdales ; à cause de ces interruptions, les collagènes formant des réseaux sont plus flexibles que les collagènes qui s'agrègent en fibrilles ; aussi forment-ils des réseaux réticulés bidimensionnels au lieu de fibrilles. Un autre type de collagène forme des fibrilles d'ancrage, qui unissent certaines lames basales au tissu conjonctif sous-jacent.

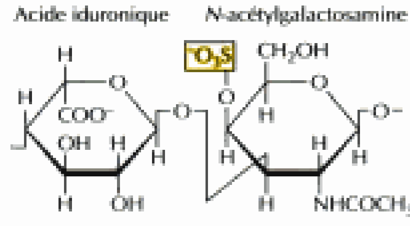
Les tissus conjonctifs possèdent aussi des **fibres élastiques**, particulièrement abondantes dans les organes qui ont l'habitude de s'allonger et de reprendre leur forme initiale ; c'est le cas du poumon, qui se gonfle à chaque inspiration et reprend sa taille originelle à la fin de l'expiration. Les fibres élastiques sont principalement constituées d'une protéine appelée **élastine**, réticulée en réseau par des liaisons covalentes formées entre les chaînes latérales de résidus lysine (semblables à celles du collagène). Ce réseau de chaînes d'élastine pontées se comporte comme un élastique, allongé par une traction et reprenant sa forme dès que disparaît la force de traction.

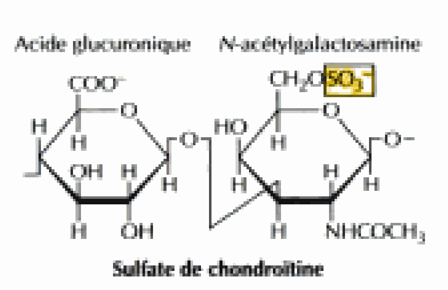
Les protéines fibrillaires de structure tendues dans la matrice extracellulaire sont noyées dans un gel constitué de polysaccharides appelés **glycosaminoglycanes (GAG)**, qui sont des répétitions d'éléments disaccharidiques (figure 12.56). Un des sucres est soit la *N*-acétylglucosamine soit la *N*-acétylgalactosamine et l'autre souvent un sucre-acide (glucuronate ou iduronate). À l'exception de l'hyaluronane, ces sucres sont substitués par des groupes sulfate. Pour ces raisons, les GAG portent des charges négatives ; comme les pectines végétales, ils fixent des ions de charge positive et accaparent des molécules d'eau en formant des gels hydratés, ce qui en fait le soutien mécanique de la matrice extracellulaire.

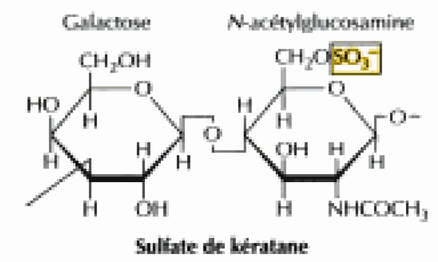
Les hyaluronanes sont les seuls d'entre les GAG à se présenter sous la forme d'une longue chaîne de nature entièrement polysaccharidique ; tous

Acide glucuronique *N*-acétylglucosamine

Hyaluronane







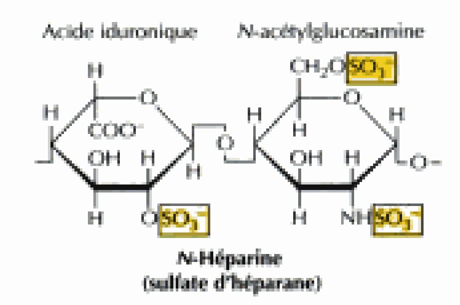
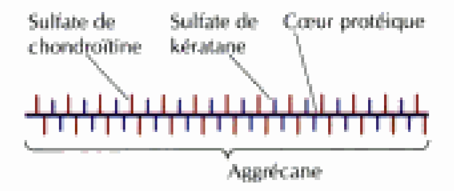


Figure 12.56
Principaux types de glycosaminoglycanes. Les glycosaminoglycanes sont des polymères d'éléments disaccharidiques. L'hyaluronane mis à part, leurs glucides portent souvent des groupes sulfate. Le sulfate d'héparane ressemble à l'héparine, mais avec moins de groupes sulfate.



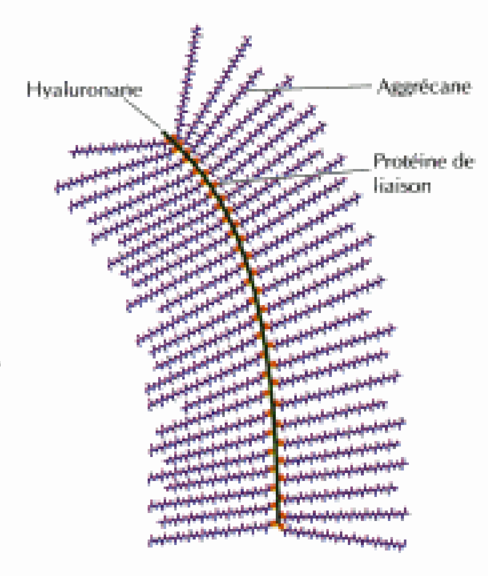


Figure 12.57
Complexes d'aggrécane et d'hyaluronane. L'aggrécane est un immense protéoglycane fait de kératane sulfate et de chondroïtine sulfate greffés à un cœur protéique ; plusieurs molécules d'aggrécane s'attachent aux longues chaînes d'hyaluronane, formant de grands complexes dans la matrice extracellulaire du cartilage. Cette association est maintenue par des protéines de liaison.

les autres GAG, attachés à des protéines, forment les **protéoglycanes**, dont la teneur en polysaccharide peut atteindre 95 % en masse. Les protéoglycanes comportent de une à plus d'une centaine de chaînes GAG greffées à des résidus sérine du tronc protéique. On a identifié plusieurs de ces protéines, dont la masse va de 10 à plus de 500 kDa ; les protéoglycanes sont donc un groupe très diversifié de macromolécules, présents non seulement dans la matrice extracellulaire, mais aussi, dans certains cas, à la surface des cellules, dont ils accroissent l'adhérence.

Plusieurs protéoglycanes s'accolent à l'hyaluronane pour former de vastes complexes au sein de la matrice extracellulaire. Un cas bien connu est celui de l'aggrécane, le protéoglycane prépondérant du cartilage (figure 12.57) ; une centaine au moins de chaînes de chondroïtine sulfate et environ 30 chaînes de kératane sulfate y sont greffées à un tronc protéique de près de 250 kDa, pour former un protéoglycane d'à peu près 3 000 kDa. Plusieurs molécules d'aggrécanes s'associent à des chaînes d'hyaluronanes pour constituer d'immenses agrégats (> 100 000 kDa) emprisonnés dans le réseau de collagène. Les protéoglycanes entrent aussi en interaction avec les collagènes et avec d'autres protéines matricielles, formant des réseaux gélatineux enrobant les protéines fibreuses structurelles de la matrice extracellulaire ; c'est le cas du perlecane, principal protéoglycane à héparane sulfate des lames basales, attaché à la fois au collagène IV et à la laminine, une protéine d'adhérence dont nous allons parler.

Les protéines d'adhérence, troisième sorte de constituants des matrices extracellulaires, servent à attacher les composants de la matrice les uns aux autres et à la surface des cellules. Le prototype en est la **fibronectine**, principale protéine d'adhérence des tissus conjonctifs. La fibronectine est une glycoprotéine composée de deux chaînes polypeptidiques, de 2 500 acides aminés chacune (figure 12.58) ; dans la matrice extracellulaire, la fibronectine est en outre pontée à elle-même en fibrilles par des liaisons disulfure. Comme la fibronectine est pourvue de sites de liaison pour le collagène et les GAG, elle réticule ces constituants de la matrice. Un autre site de la molécule de fibronectine, reconnu par des récepteurs siégeant à la surface des cellules, sert à retenir ces cellules dans la matrice extracellulaire.

Les lames basales comportent une autre protéine d'adhérence appelée **laminine** (figure 12.59). Comme le collagène de type IV, les laminines s'assemblent spontanément en réseau ; ces réseaux de laminine sont les principaux composants structuraux des lames basales syn-

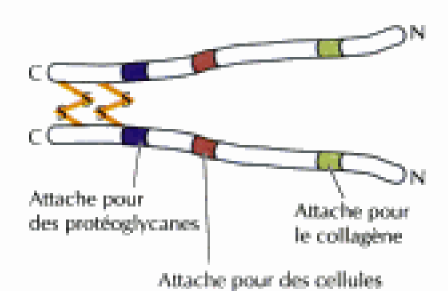


Figure 12.58
Structure de la fibronectine. La fibronectine est un dimère de chaînes polypeptidiques jumelles unies par des liaisons disulfure près de leur bout carboxyle. On a marqué les sites où s'attachent les protéoglycanes, les cellules et le collagène. La molécule porte encore d'autres sites de liaison, non indiqués.

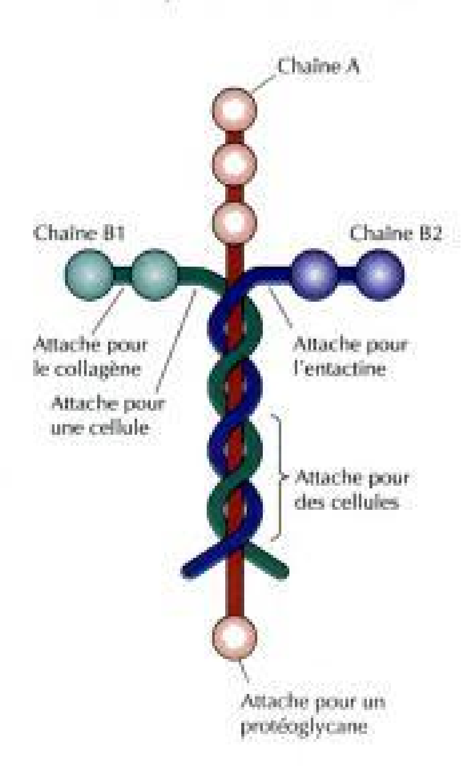


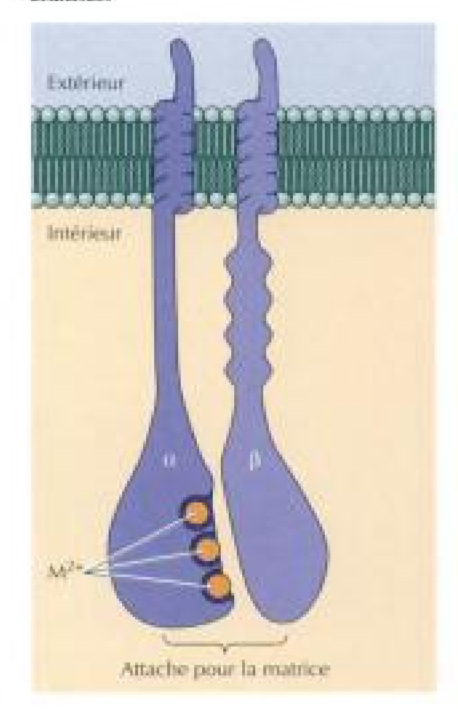
Figure 12.59
Structure de la laminine. La laminine est faite de trois chaînes polypeptidiques désignées A, B1 et B2. On a indiqué certains sites de liaison, notamment pour l'entactine, pour le collagène de type IV, pour les protéoglycanes et pour des récepteurs cellulaires superficiels.

thétisées chez le jeune embryon et dépourvues de collagène. Les laminines portent aussi des sites de fixation pour les récepteurs cellulaires superficiels, pour le collagène de type IV et pour le perlecane. En outre, les laminines sont fermement associées à une autre protéine d'adhérence, appelée **entactine** ou **nidogène**, qui s'attache aussi au collagène de type IV ; à cause de ces nombreuses interactions, laminine, entactine, collagène de type IV et perlecane constituent les réseaux réticulés des lames basales.

Les principaux récepteurs superficiels qui arriment les cellules à la matrice extracellulaire sont les **intégrines**, une famille de protéines transmembranaires constituées de deux protomères, les éléments α et β (figure 12.60) ; on en connaît une vingtaines d'espèces, formées par la combinaison des 14 protomères α identifiés et des huit protomères β identifiés. Les intégrines s'attachent à de courtes séquences d'acides aminés présentes dans plusieurs composants de la matrice extracellulaire, notamment le collagène, la fibronectine et la laminine. Le premier site, attiré par l'intégrine, qu'on a découvert est la séquence Arg-Gly-Asp-, reconnue par plusieurs membres de la famille des intégrines ; d'autres intégrines, par contre, reconnaissent d'autres séquences peptidiques, par exemple, la séquence -Asp-Gly-Glu-Ala- des collagènes et des laminines.

Outre qu'elles arriment les cellules à la matrice extracellulaire, les intégrines servent d'ancrage au cytosquelette (figure 12.61) ; cet ancrage du cytosquelette à la matrice extracellulaire stabilise les jonctions cellules-matrice. Les interactions entre intégrines et cytosquelette se singularisent au niveau de deux types de jonctions entre la cellule et la matrice, à savoir les **plaques d'adhérence** et les **hémidesmosomes**, déjà décrits au chapitre 11. Les plaques d'adhérence arriment toutes sortes de cellules, comme les fibroblastes, à la matrice extracellulaire ; en s'attachant aux câbles de filaments d'actine, le domaine cytoplasmique des protomères β d'intégrines soude le cytosquelette d'actine à ces jonctions cellule-matrice. Les hémidesmosomes sont des sites d'attache propres aux cellules épithéliales, où une intégrine singulière (appelée $\alpha_6\beta_4$) entre au contact des filaments intermédiaires et non de l'actine ; comme l'intégrine $\alpha_6\beta_4$ s'attache à la laminine, l'hémidesmosome arrime la cellule épithéliale à la lame basale.

Figure 12.60
Structure des intégrines. Les intégrines sont des hétérodimères composés de deux éléments transmembranaires, les chaînes α et β. La chaîne α séquestre les cations divalents (M^{2+}). La région où s'attache la matrice extracellulaire se compose d'une partie de chacune des deux chaînes.



INTERACTIONS ENTRE CELLULES

Des interactions directes entre cellules ainsi qu'entre cellules et matrice extracellulaire sont essentielles au développement et au fonctionnement des organismes pluricellulaires. On connaît des interactions momentanées, telles que celles qui s'effectuent entre cellules du système immunitaire et celles qui conduisent les globules blancs du sang jusqu'aux sites d'inflammation tissulaires. Dans d'autres cas, des jonctions permanentes entre cellules jouent un rôle clé dans l'arrangement des cellules en un tissu ; ainsi, faut-il plusieurs types de jonctions intercellulaires stables pour maintenir l'intégrité structurale et la fonction des feuillets de cellules épithéliales. Les cellules végétales s'associent aussi à leurs voisines non seulement par des interactions entre leur paroi cellulaire, mais aussi par des jonctions particulières unissant leur membrane plasmique.

Protéines d'adhérence cellulaire

L'accolement d'une cellule à sa voisine est un processus sélectif, tel qu'une cellule donnée n'adhère qu'à tel ou tel type donné de cellule. Les premières

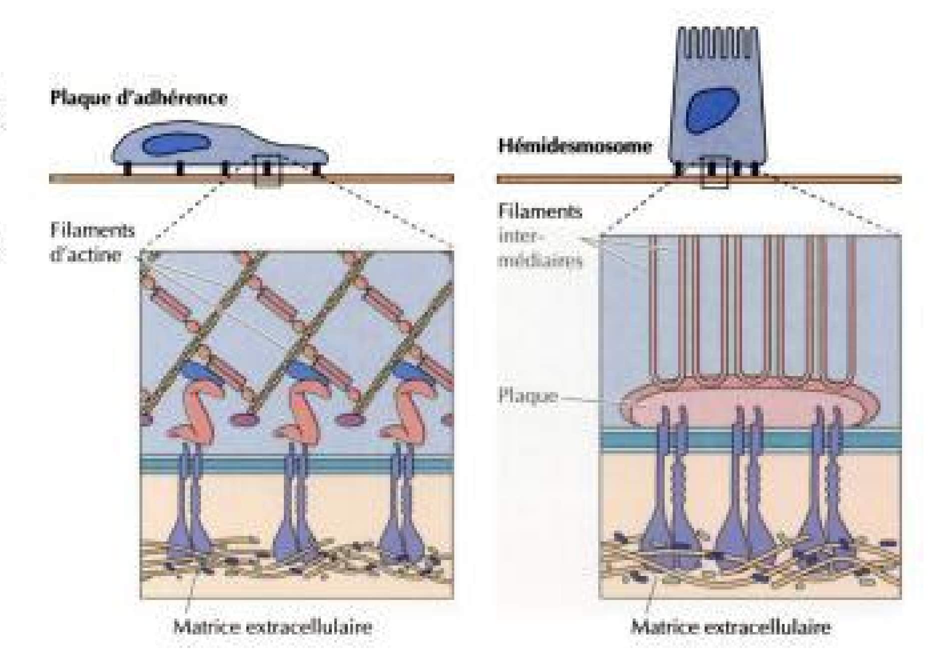


Figure 12.61
Liens entre cellules et matrice extracellulaire. Les intégrines servent à deux sortes de jonctions stables dans lesquelles le cytosquelette est réuni à la matrice extracellulaire. Dans les plaques d'adhérence, des câbles de filaments d'actine sont arrimés aux éléments β de la plupart des intégrines *via* leur association avec plusieurs autres protéines, dont l'actinine α, la taline et la vinculine (voir figure 11.13). Dans les hémidesmosomes, l'intégrine $\alpha_6 \beta_4$ unit la lame basale aux filaments intermédiaires, qui sont ancrés à une plaque dense de protéines intracellulaires.

études démontrant cette sélectivité furent effectuées sur le développement embryonnaire ; elles montrèrent que les cellules isolées d'un tissu (par exemple, le foie) s'accolent aux cellules du même tissu plutôt qu'aux cellules d'un autre tissu (par exemple, le cerveau). Cette adhérence intercellulaire sélective est due à des protéines transmembranaires appelées **molécules d'adhérence cellulaire**, qu'on a ressemblées en quatre groupes : les **sélectines**, les **intégrines**, les **membres de la superfamille des immunoglobulines (Ig)**(un de leurs domaines structural ressemble à un domaine des Ig), et les **cadhérines** (tableau 12.3). L'adhérence intercellulaire due aux sélectines, aux intégrines et aux cadhérines exige la présence d'ions Ca^{2+} ou Mg^{2+}, de sorte que beaucoup d'interactions par contact direct entre cellules ne se produisent qu'en présence de Ca^{2+} ou de Mg^{2+}.

Les sélectines, les intégrines et les membres de la superfamille des Ig interviennent dans des adhérences intercellulaires momentanées, telles l'interaction entre cellules endothéliales et leucocytes du courant sanguin lorsque ceux-ci gagnent un tissu enflammé (figure 12.62). Les sélectines déjà décrites dans ce chapitre reconnaissent des glucides de la surface cellulaire et amorcent l'adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales ; de plus solides adhérences se forment ensuite, aux cours desquelles des intégrines de la surface des leucocytes se fixent à des molécules d'adhérence intercellulaire (ICAM), qui appartiennent à la superfamille des Ig et s'expriment à la surface des cellules endothéliales ; une fois bien arrimé, le leucocyte peut franchir la paroi des capillaires et parvenir au tissu sous-jacent en se faufilant entre deux cellules endothéliales.

Table 12.3 Molécules d'adhérence cellulaire

Famille	Ligands reconnus	Jonction cellulaire stable
Sélectines	Glucides	Aucune
Intégrines	Matrice extracellulaire	Plaques d'adhérence et hémidesmosome
	Membres de la famille des Ig	Aucune
Superfamille des Ig	Intégrines	Aucune
	Interactions homophiles	Aucune
Cadhérines	Interactions homophiles	Jonction serrée et desmosome

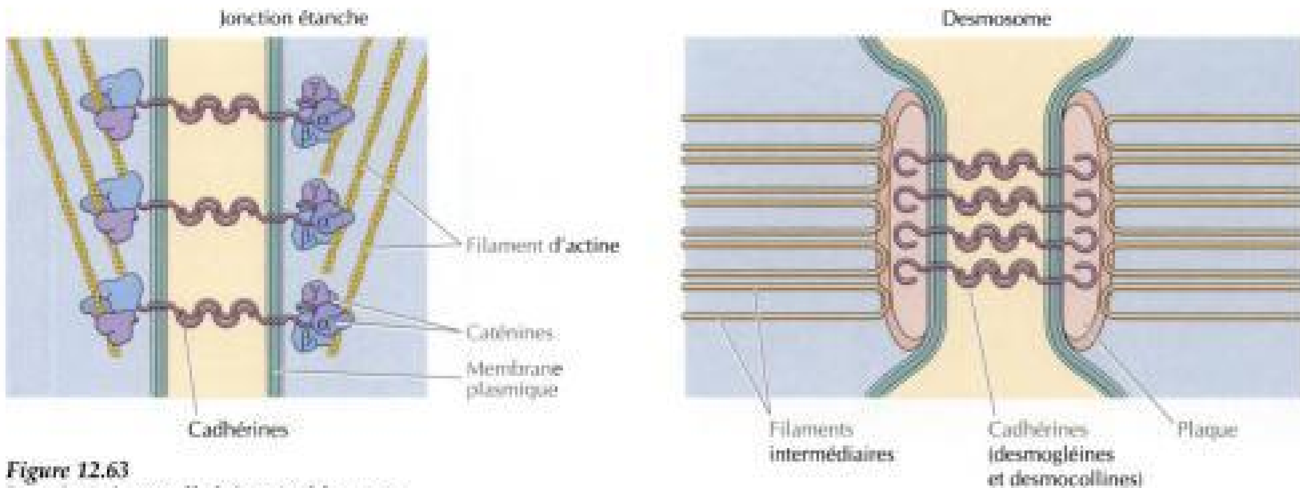


Figure 12.63
Jonctions intercellulaires stables par l'entremise des cadhérines. Des interactions homophiles entre cadhérines accolent de façon stable une cellule à ses voisines. Dans la jonction étanche, les cadhérines s'unissent à des câbles de filaments d'actine *via* les caténines (voir figure 11.14). Dans le desmosome, des plaques protéiques denses unissent des membres de la superfamille des cadhérines (desmogléines et desmocollines) aux filaments intermédiaires (voir figure 11.34).

tuellement associées à des jonctions d'adhérence et à des desmosomes au sein d'un **complexe jonctionnel** (figure 12.64) sont cruciales pour que les feuillets de cellules épithéliales fonctionnent comme barrières entre des compartiments liquides voisins. Ainsi, l'épithélium intestinal sépare la lumière de l'intestin du tissu conjonctif sous-jacent, où siègent les capillaires sanguins. En faisant de l'épithélium une barrière physiologique, la jonction étanche remplit deux rôles. D'une part, elle forme une soudure qui empêche les molécules (et les ions) de passer entre les cellules du feuillet épithélial. D'autre part, la jonction étanche sépare le domaine apical du domaine basolatéral de la membrane plasmique d'une cellule, car elle s'oppose à la diffusion libre des lipides et des protéines membranaires entre ces deux domaines ; ainsi, les systèmes de transport propres au domaine apical et au domaine basolatéral peuvent régler le trafic des molécules entre compartiments extracellulaires, par exemple, le transport de glucose entre la lumière intestinale et le courant sanguin (voir figure 12.32).

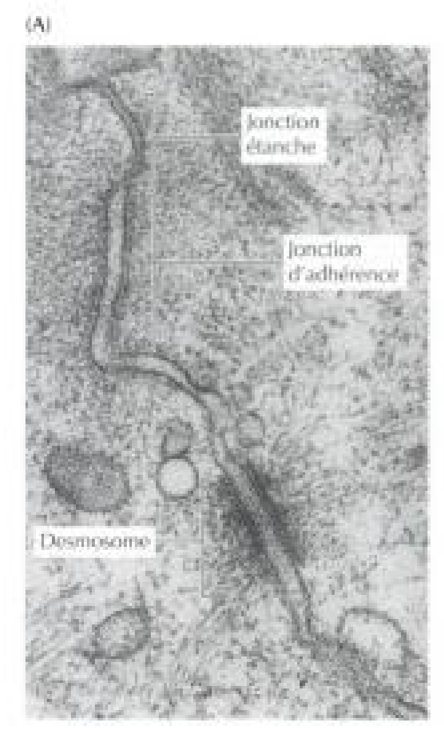
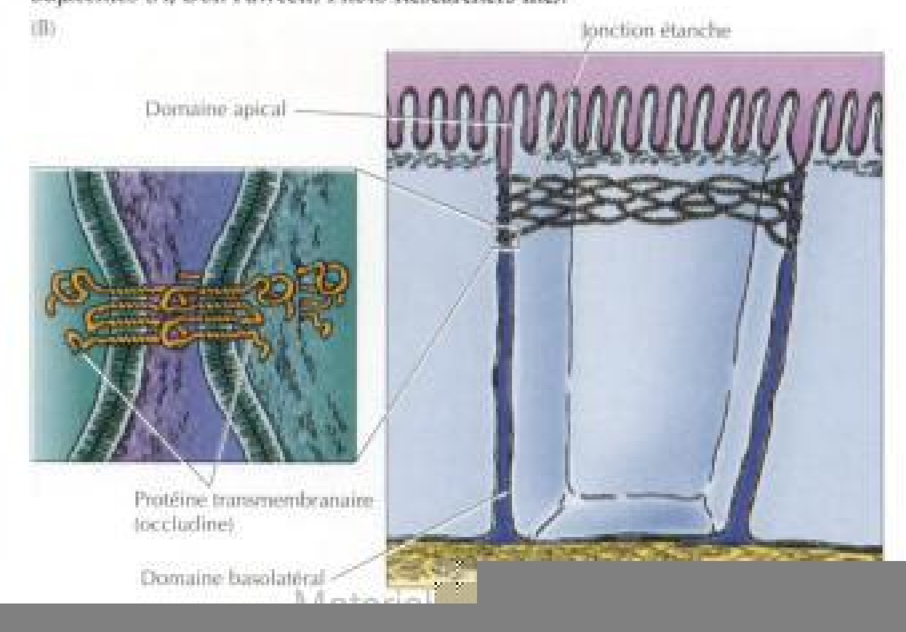


Figure 12.64
Jonction étanche . (A) Micrographie électronique de cellules épithéliales unies par un complexe d'ancrage, comprenant une jonction étanche, une jonction d'adhérence et un desmosome. (B) La jonction étanche se forme par accolement de chaînes de protéines transmembranaires (occludine) appartenant à des cellules adjacentes (A, Don Fawcett/Photo Researchers Inc).



S'il existe un contact intime entre deux cellules adjacentes, c'est bien au niveau de la jonction étanche. On a d'abord décrit ces jonctions comme des endroits où les feuillets externes des membranes plasmiques de ces cellules se fondaient l'un dans l'autre, mais on a montré qu'il n'en est rien. Les jonctions sont constituées d'un réseau de fils protéiques encerclant complètement la cellule (voir figure 12.64) ; chaque fil de ce réseau est une protéine transmembranaire, l'occludine, qui s'attache à des protéines de même nature appartenant à la cellule adjacente, en barrant l'interstice entre les deux membranes plasmiques.

Jonctions lacunaires

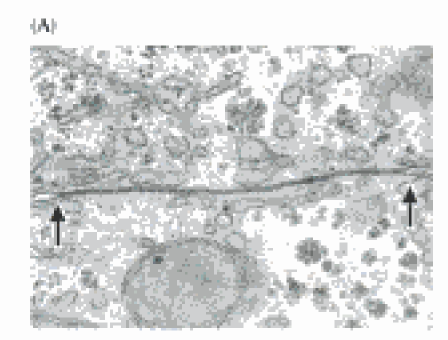
La **jonction lacunaire**, présente dans la plupart des tissus animaux, sert de connexion directe entre les cytoplasmes de deux cellules adjacentes ; elle ménage un tunnel ouvert à travers la membrane plasmique, par où diffusent librement d'une cellule à sa voisine les ions et les petites molécules (de moins de mille daltons environ), mais non les protéines et les acides nucléiques. C'est pourquoi, les jonctions lacunaires couplent à la fois les activités métaboliques et les réponses électriques des cellules qu'elles unissent. La plupart des cellules des tissus animaux, notamment épithéliaux, endothéliaux, cardiaque et musculaire, communiquent par des jonctions lacunaires. Dans les cellules électriquement excitables, comme les cellules du muscle cardiaque, le passage direct des ions à travers les jonctions lacunaires couple et synchronise la contraction des cellules voisines. Les jonctions lacunaires laissent aussi passer certaines molécules messagères intracellulaires d'une cellule à ses voisines, notamment l'AMPc et Ca^{2+}, garantissant une réponse coordonnée dans toutes les cellules d'un tissu.

Les jonctions lacunaires sont constituées de protéines transmembranaires appelées **connexines** (figure 12.65). Six molécules de connexines s'assemblent pour former un manchon cylindrique creusé d'un pore aqueux ; cet ensemble de connexines dans la membrane plasmique d'une cellule va ensuite se centrer sur un ensemble identique d'une cellule voisine, en formant un pertuis entre les deux cytoplasmes ; il ne subsiste entre les membranes plasmiques des deux cellules que l'espace correspondant aux domaines extracellulaires des connexines, d'où le terme anglais de *gap jonction* inventé par les microscopistes.

Accolement des cellules végétales et plasmodesmes

Les cellules végétales adhèrent les unes aux autres non par le truchement de protéines transmembranaires, mais par leur paroi membranaire, notamment par une région de leur paroi particulièrement riche en pectine, la **lamelle médiane**, sorte de colle qui unit les cellules contiguës. Grâce à la rigidité de leur paroi, les cellules végétales s'associent de façon définitive sans devoir construire entre leurs cytosquelettes des connections, du genre des desmosomes ou des jonctions serrées auxquels ont recours les cellules animales. Cependant, les cellules végétales contiguës communiquent entre elles par des ramifications cytoplasmiques, les **plasmodesmes**, qui jouent un rôle analogue à celui

(A)



(B)

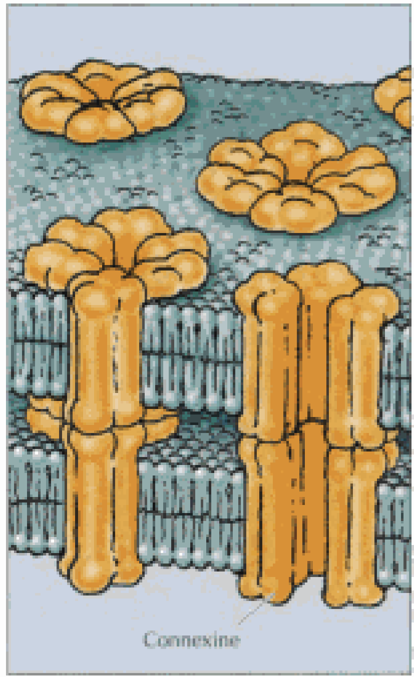


Figure 12.65
Jonction lacunaire. (A) Micrographie électronique d'une jonction lacunaire (flèche) unissant deux cellules hépatiques. (B) Une jonction lacunaire est un ensemble de six molécules de connexine qui ménagent entre elles un tunnel de communication à travers les membranes plasmiques des deux cellules. (A, Don Fawcett et R. Wood/Photo Researchers Inc).

qui font passer les molécules polaires et les molécules chargées à travers la membrane plasmique sans qu'elles entrent en contact avec son cœur hydrophobe.

Tunnels à ions : Les tunnels à ions laissent passer sélectivement certains ions à travers la membrane plasmique. On connaît bien ceux des myocytes et des neurones, sur lesquels repose la transmission des signaux électriques.

tunnel à ions, tunnel ouvert par un ligand, tunnel ouvert par une variation du potentiel membranaire, méthode de blocage du potentiel, équation de Nernst, potentiel d'action

Transport actif mû par l'ATP : L'énergie de rupture de l'ATP permet à certaines molécules de remonter leur gradient électrochimique.

transport actif, pompe à ions, pompe à Na^+-K^+ ; Na^+-K^+-ATPase, transporteur ABC

Transport actif mû par un gradient ionique : Souvent un gradient d'ions sert de source d'énergie pour entraîner le transport actif d'autres molécules.

symport, uniport, antiport

ENDOCYTOSE

Phagocytose : Certaines cellules ingèrent de grosses particules, comme des bactéries ou des débris cellulaires, par phagocytose.

endocytose, phagocytose, pinocytose, phagosome, phagolysosome

Endocytose par récepteur interposé : La mieux connue des formes d'endocytose est l'endocytose par récepteur interposé, responsable de la capture sélective de macromolécules particulières.

endocytose par récepteur interposé, puits tapissé de clathrine, vésicule tapissée de clathrine, ligand, lipoprotéine de basse densité (LDL), endocytose de phase liquide, micropinocytose

Trafic de protéines au cours de l'endocytose : Les molécules capturées par endocytose sont prises dans des endosomes, où elles sont triées en vue d'un recyclage vers la membrane plasmique ou en vue de leur dégradation dans un lysosome.

endosome, désensibilisation de récepteur, transcytose

PAROI CELLULAIRE ET MATRICE EXTRACELLULAIRE

Paroi bactérienne : Le constituant principal des parois bactériennes est un peptidoglycane, formé de polysaccharides pontés par de courts peptides.

peptidoglycane

Paroi des cellules végétales : Chez les algues, les champignons et les plantes supérieures, la paroi cellulaire se compose de polysaccharides fibreux (dont la cellulose) noyés dans une matrice gélatineuse de polysaccharides et de protéines. Grâce à la rigidité de leur paroi, les cellules végétales s'étirent rapidement par prise d'eau.

chitine, cellulose, microfibrille cellulosique, hémicellulose, pectine, paroi cellulaire primaire, paroi cellulaire secondaire, lignine, pression de turgescence, auxine, cellulose synthase

La matrice extracellulaire : Les cellules des tissus animaux sont enrobées d'une matrice extracellulaire composée de protéines et de polysaccharides sécrétés. Des récepteurs siégeant à la surface cellulaire s'attachent à la matrice extracellulaire et arriment le cytosquelette aux points où la cellule s'unit à la matrice.

matrice extracellulaire, lame basale (ou membrane basale), collagène, fibrille de collagène, procollagène, fibre élastique, élastine, glycosaminoglycane (GAG), protéoglycane, fibronectine, laminine, entactine, nidogène, intégrine, plaque d'adhérence, hémidesmosome

INTERACTIONS DE CELLULE À CELLULE

Protéines d'adhérence cellulaire : Les interactions sélectives entre cellules sont dues à quatre types de protéines d'adhérence intercellulaire : des sélectines, des intégrines, des membres de la superfamille des Ig et des cadhérines. Les cadhérines arriment le cytosquelette des cellules voisines en des points de jonction intercellulaires permanents.

molécule d'adhérence cellulaire, sélectine, intégrine, superfamille des immunoglobulines (Ig), cadhérine, interaction hétérophile, interaction homophile, plaque d'adhérence, desmosome

Jonction étanche : La jonction étanche empêche les molécules de passer librement d'une cellule épithéliale à ses voisines et partage la membrane plasmique en domaine apical et domaine basolatéral.

jonction étanche, complexe jonctionnel

Lanyi, J. K. 1995. Bacteriorhodopsin as a model for proton pumps. *Nature* 375: 461–463. [R]

Levitan, I. B. and L. K. Kaczmarek. 1991. *The Neuron: Cell and Molecular Biology*. New York: Oxford Univ. Press.

Lingrel, J. B. and T. Kuntzweiler. 1994. Na^+,K^+-ATPase. *J. Biol. Chem.* 269: 19659–19662. [R]

Marty, A. 1991. Les prix Nobel 1991 : le développement de la technique du patch-clamp. *La Recherche* n° 238:1476.

Miller, R. J. 1992. Voltage-sensitive Ca^{2+} channels. *J. Biol. Chem.* 267: 1403–1406. [R]

Neher, E. and B. Sakmann. 1992. The patch clamp technique. *Sci. Am.* 266(3): 44–51. [R]

Sakmann, B. 1992. Elementary steps in synaptic transmission revealed by currents through single ion channels. *Science* 256: 503–512. [R]

Silverman, M. 1991. Structure and function of hexose transporters. *Ann. Rev. Biochem.* 60: 757–794. [R]

Unwin, N. 1993. Neurotransmitter action: Opening of ligand-gated ion channels. *Cell* 72/*Neuron* 10 (Suppl.): 31–41. [R]

Welsh, M. J. and A. E. Smith. 1993. Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell* 73: 1251–1254. [R]

Welsh, M. & Smith, A. 1996. La mucoviscidose. *Pour la Science* fév.1996:66.

Endocytose

Beron, W., C. Alvarez-Dominguez, L. Mayorga and P. D. Stahl. 1995. Membrane trafficking along the phagocytic pathway. *Trends Cell Biol.* 5: 100–104. [R]

Brown, M. S. & Goldstein, J. L. 1984. Les récepteurs de LDL, le cholestérol et l'athérosclérose. *Pour la Science* n° 87:62-71.[R]

Brown, M. S. and J. L. Goldstein. 1986. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232: 34–47. [R]

Fruchard, J.-C. 1992. Le transport de cholestérol et sa fixation dans les artères. *Pour la Science* n°175:40-47.[R]

Gruenberg, J. and K. E. Howell. 1989. Membrane traffic in endocytosis: Insights from cell-free assays. *Ann. Rev. Cell Biol.* 5: 453–481. [R]

Lienhard, G *et al.* 1992. L'absorption de glucose par les cellules. *Pour la Science* n° 173:68-73.

Mostov, K., G. Apodaca, B. Aroeti and C. Okamoto. 1992. Plasma membrane protein sorting in polarized epithelial cells. *J. Cell Biol.* 116: 577–583. [R]

Mostov, K. and N. E. Simister. 1985. Transcytosis. *Cell* 43: 389–390. [R]

Nelson, W. J. 1992. Regulation of cell surface polarity from bacteria to mammals. *Science* 258: 948–955. [R]

Parton, R. G. and K. Simons. 1995. Digging into caveolae. *Science* 269: 1398–1401. [R]

Pearse, B. M. F. and M. S. Robinson. 1990. Clathrin, adaptors, and sorting. *Ann. Rev. Cell Biol.* 6: 151–171. [R]

Rabinovitch, M. 1995. Professional and non-professional phagocytes: An introduction. *Trends Cell Biol.* 5: 85–87. [R]

Sudhof, T. C. 1995. The synaptic vesicle cycle: A cascade of protein-protein interactions. *Nature* 375: 645–653. [R]

Swanson, J. A. and C. Watts. 1995. Macropinocytosis. *Trends Cell Biol.* 5:424–428. [R]

Trowbridge, I. S., J. F. Collawn and C. R. Hopkins. 1993. Signal-dependent membrane protein trafficking in the endocytic pathway. *Ann. Rev. Cell Biol.* 9: 129–161. [R]

Van Deurs, B., P. K. Holm, K. Sandvig and S. H. Hansen. 1993. Are caveolae involved in clathrin-independent endocytosis? *Trends Cell Biol.* 3: 249–251. [R]

Parois cellulaires et matrice extracellulaire

Carpita, N. C. and D. M. Gibeaut. 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: Consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J.* 3: 1–30. [R]

Cyr, R. J. 1994. Microtubules in plant morphogenesis: Role of the cortical array. *Ann. Rev. Cell Biol.* 10: 153–180. [R]

Engel, J. 1992. Laminins and other strange proteins. *Biochemistry* 31: 10643–10651. [R]

Fosket, D. E. 1994. *Plant Growth and Development: A Molecular Approach*. San Diego: Academic Press.

Hynes, R. O. 1990. *Fibronectins*. New York: Springer-Verlag.

Hynes, R. O. 1992. Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69: 11–25. [R]

Kjellén, L. and U. Lindahl. 1991. Proteoglycans: Structures and interactions. *Ann. Rev. Biochem.* 60: 443–475. [R]

Loftus, J. C., J. W. Smith and M. H. Ginsberg. 1994. Integrin-mediated cell adhesion: The extracellular face. *J. Biol. Chem.* 269: 25235–25238. [R]

McDonald, J. A. 1988. Extracellular matrix assembly. *Ann. Rev. Cell Biol.* 4: 183–207. [R]

McNeil, M., A. G. Darvill, S. C. Fry and P. Albersheim. 1984. Structure and function of the primary cell walls of plants. *Ann. Rev. Biochem.* 53: 625–663. [R]

Mecham, R. P. 1991. Laminin receptors. *Ann. Rev. Cell Biol.* 7: 71–91. [R]

Neidhardt, F. C., J. L. Ingraham and M. Schaechter. 1990. *Physiology of the Bacterial Cell: A Molecular Approach*. Sunderland, MA.: Sinauer Associates.

Prockop, D. J. and K. I. Kivirikko. 1995. Collagens: Molecular biology, diseases, and potentials for therapy. *Ann. Rev. Biochem.* 64: 403–434. [R]

Ruoslahti, E. 1988. Fibronectin and its receptors. *Ann. Rev. Biochem.* 57: 375–413. [R]

Ruoslahti, E. 1988. Structure and biology of proteoglycans. *Ann. Rev. Cell Biol.* 4: 229–255. [R]

Talz, L. 1994. Expansins: Proteins that promote cell wall loosening in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 7387–7389. [R]

Varner, J. E. and L.-S. Lin. 1989. Plant cell wall architecture. *Cell* 56: 231–239. [R]

Vertel, B. M. 1995. The ins and outs of aggrecan. *Trends Cell Biol.* 5: 458–464. [R]

Vuorio, E. and B. de Crombrugghe. 1990. The family of collagen genes. *Ann. Rev. Biochem.* 59: 837–872. [R]

Yurchenco, P. D. and J. C. Schnitty. 1990. Molecular architecture of basement membranes. *FASEB J.* 4: 1577–1590. [R]

Interactions entre cellules

Beyer, E. C. 1993. Gap junctions. *Int. Rev. Cytol.* 137C: 1–37. [R]

Chothia, C. & Jones, E.Y. 1997. The molecular structure of cell-adhesion molecules. *Adv. Prot. Chem.* 66:823-862.[R]

Citi, S. 1993. The molecular organization of tight junctions. *J. Cell Biol.* 121: 485–489. [R]

Epel, B. L. 1994. Plasmodesmata: Composition, structure, and trafficking. *Plant Mol. Biol.* 26: 1343–1356. [R]

Geiger, B. and O. Ayalon. 1992. Cadherins. *Ann. Rev. Cell Biol.* 8: 307–332. [R]

Gumbiner, B. M. 1993. Breaking through the tight junction barrier. *J. Cell Biol.* 123: 1631–1633. [R]

Gumbiner, B. M. 1996. Cell adhesion: The molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 84: 345–357. [R]

Kumar, N. M. and N. B. Gilula. 1996. The gap junction communication channel. *Cell* 84: 381–388. [R]

Meyerowitz, E. 1995. La génétique des fleurs. *Pour la Science* 207:58.

Oata, S.-I. & Yamada, K. M. 1995. Fibronectin and cell adhesion : specificity of integrin-ligand interaction. *Adv. Enzymol.* 70:1-21.

Praillet, Ch. *et al.* 1998. Les protéoglycanes. I. Molécules aux multiples fonctions... futures molécules thérapeutiques. *Médecine/Sciences* 14:412-420.[R]

Schwarz, M. A., K. Owaribe, J. Kartenbeck and W. W. Franke. 1990. Desmosomes and hemidesmosomes: Constitutive molecular components. *Ann. Rev. Cell Biol.* 6: 461–491. [R]

Snyder, S. 1985. Les molécules des échanges entre cellules. *Pour la Science* n°98:94-104.

Springer, T. A. 1990. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346: 425–434. [R]

Springer, T. A. 1994. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: The multistep paradigm. *Cell* 76: 301–314. [R]

Takeichi, M. 1991. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* 251: 1451–1455. [R]

Zambryski, P. 1995. Plasmodesmata: Plant channels for molecules on the move. *Science* 270: 1943–1944. [R]

4e PARTIE

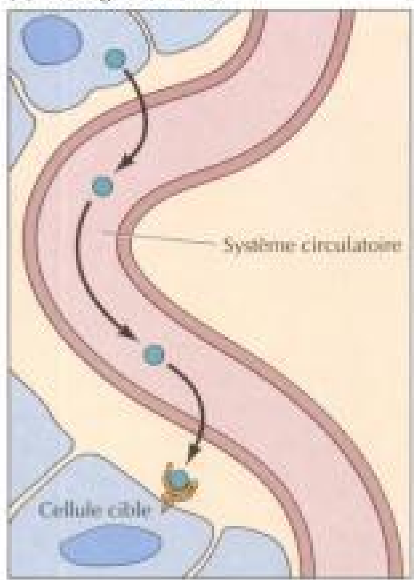
Régulation cellulaire



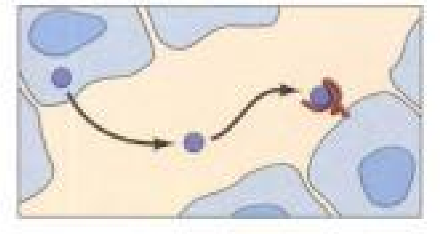
Georgia O'Keefe, *Corn, Dark I*, 1924

ment. La complexité structurale des messagers moléculaires trouvés chez les plantes et chez les animaux va du gaz le plus simple aux protéines ; certaines de ces molécules portent le signal sur de longues distances, d'autres livrent leur information sur place, aux cellules voisines. En outre, les molécules de signalisation diffèrent quant à leur mode d'action sur la cellule cible ; certaines sont capables de passer la membrane plasmique et de se fixer à des récepteurs intracellulaires, dans le cytoplasme ou dans le noyau, tandis que la plupart se fixent à des récepteurs exprimés à la surface de la cellule cible. Nous allons présenter les principaux types de molécules signalisatrices ainsi que les récepteurs avec lesquels elles entrent en contact ; ensuite nous nous tiendrons aux mécanismes par lesquels les récepteurs de la surface cellulaire gouvernent le comportement des cellules.

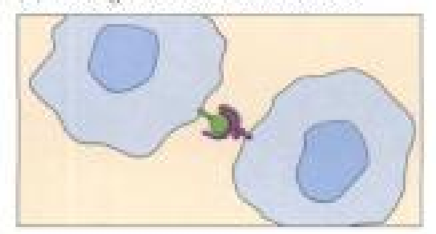
(A) Message endocrine



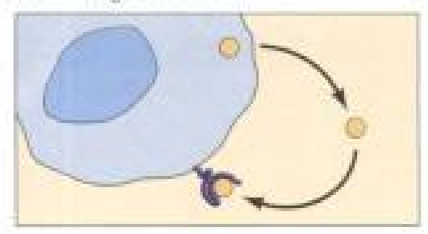
(B) Message paracrine



(C) Message direct de cellule à cellule



(D) Message autocrine



Nature des messageries intercellulaires

On groupe souvent les divers modes de signalisation intercellulaire en trois catégories principales, d'après la distance parcourue par le signal (figure 13.1). Dans la **signalisation endocrine**, la molécule signal (une **hormone**) est sécrétée par une cellule endocrine particulière et entraînée au loin, par le courant sanguin, jusqu'à la cellule cible. L'exemple classique est celui des œstrogènes, des stéroïdes hormonaux produits par l'ovaire et actifs sur le développement et l'entretien du système génital et des caractères sexuels secondaires femelles. Chez l'animal, on connaît au moins 50 hormones, sécrétées par des glandes comme l'hypophyse, la thyroïde, la parathyroïde, le pancréas, les surrénales et les gonades.

Contrairement aux hormones, certaines molécules signalisatrices agissent sur place, en influençant le comportement des cellules du voisinage. Dans la **signalisation paracrine**, les molécules libérées par une cellule vont toucher des cellules cibles du voisinage ; c'est le cas des neuromédiateurs qui transmettent le signal du neurone au niveau d'une synapse. De plus, certaines cellules répondent à des molécules signalisatrices exprimées à la surface d'une cellule voisine, sans même que ces molécules soient libérées dans le liquide interstitiel. Ces modes de signalisation jouent des rôles clé dans la régulation des interactions entre cellules, notamment celle des interactions entre différents types cellulaires lors du développement de l'embryon.

Enfin, certaines cellules répondent à des molécules signalisatrices qu'elles-mêmes produisent. Un exemple important de cette **signalisation autocrine** est la réponse montée par le système immunitaire des vertébrés en présence d'antigènes étrangers. Certains types de lymphocytes T répondent à une stimulation antigénique en synthétisant un facteur de croissance qui enclenche leur propre prolifération, de sorte que le nombre de lymphocytes T sensibles s'accroît et que la réponse immunitaire se renforce. Notons qu'une signalisation autocrine anormale peut induire une prolifération cellulaire anarchique, autrement dit un cancer (voir chapitre 15) ; dans ce cas, la cellule cancéreuse synthétise un facteur de croissance auquel elle répond elle-même, en accentuant continuellement sa propre prolifération anarchique.

Hormones stéroïdes et famille des récepteurs de stéroïdes

Comme nous venons de le mentionner, les molécules signalisatrices agissent toutes en se fixant à des récepteurs exprimés par leurs cellules cibles ; dans

Figure 13.1
Nature des messageries intercellulaires. (A) Dans la signalisation endocrine, les hormones sont véhiculées par le système circulatoire et touchent des cellules cible éloignées. (B) Dans la signalisation paracrine, la molécule libérée par une cellule exerce son action localement, sur des cellules cible du voisinage. (C) Au lieu d'être libérées dans le liquide extracellulaire, certaines molécules-signal restent ancrées à la surface cellulaire et servent de ligand dans une transmission de cellule à cellule. (D) Dans la signalisation autocrine, la cellule produit une molécule-signal à laquelle elle-même répond.

Testostérone

Oestradiol (un œstrogène)

Progestérone

Cortisol (un glucocorticoïde)

Aldostérone (un minéralocorticoïde)

Hormone thyroïdienne

Vitamine D_3

Acide rétinoïque

Figure 13.2
Structure des hormones stéroïdiennes, de l'hormone thyroïdienne, de la vitamine D_3 et de l'acide rétinoïque. Les stéroïdes comprennent les hormones sexuelles (testostérone, œstrogène et progestérone), les glucocorticoïdes et les minéralocorticoïdes.

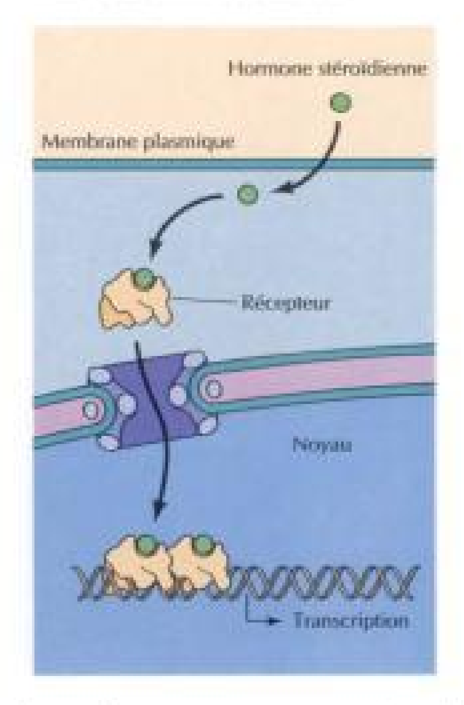
beaucoup de cas, ces récepteurs s'expriment à la surface de la cellule cible, mais certains sont des protéines intracellulaires localisées dans le cytosol ou dans le noyau. Cette sorte de récepteur intracellulaire répond à de petites molécules signalisatrices que leur hydrophobie laisse diffuser à travers la membrane plasmique. Ce groupe de molécules signal, représenté par les **hormones stéroïdiennes**, comprend aussi les hormones thyroïdiennes, la vitamine D_3 et l'acide rétinoïque (figure 13.2).

Les stéroïdes hormonaux (testostérone, œstrogène, progestérone, corticoïdes et ecdysone) dérivent tous du cholestérol. La **testostérone**, les **œstrogènes** et la **progestérone** sont les stéroïdes sexuels produits par les gonades. Les **corticostéroïdes** sont synthétisés par les glandes surrénales ; ils comprennent les **glucocorticoïdes**, actifs sur la fourniture de glucose à plusieurs types de cellules, et les **minéralocorticoïdes**, qui effectuent la régulation de l'équilibre ionique et hydrique dans le rein. L'**ecdysone** est une hormone essentielle au développement des insectes puisqu'elle enclenche la métamorphose de la larve en individu adulte.

Bien que l'hormone thyroïdienne, la vitamine D_3 et l'acide rétinoïque diffèrent des stéroïdes par leur structure et leurs effets, toutes ces molécules agissent sur leurs cellules cibles par le même mécanisme. L'**hormone thyroïdienne** est synthétisée dans la glande thyroïde à partir de la tyrosine ; elle intervient dans le développement embryonnaire et dans le métabolisme. La **vitamine D_3** ajuste le métabolisme de Ca^{2+} et la croissance des os. L'**acide rétinoïque** et les substances apparentées (**rétinoïdes**), synthétisés à partir de la vitamine A, jouent un rôle important dans le développement embryonnaire des vertébrés.

À cause de leur caractère hydrophobe, les hormones stéroïdiennes, l'hormone thyroïdienne, le vitamine D_3 et l'acide rétinoïque pénètrent facilement dans la cellule, par diffusion à travers la membrane plasmique (figure 13.3). Parvenues dans la cellule, ces hormones se fixent à des récepteurs intracel-

Figure 13.3
Action des hormones stéroïdiennes. Les hormones stéroïdiennes diffusent à travers la membrane plasmique et se fixent à des récepteurs intracellulaires, qui stimulent directement la transcription des gènes qui en sont la cible. Les récepteurs d'hormones stéroïdiennes s'attachent à l'ADN sous forme de dimères.



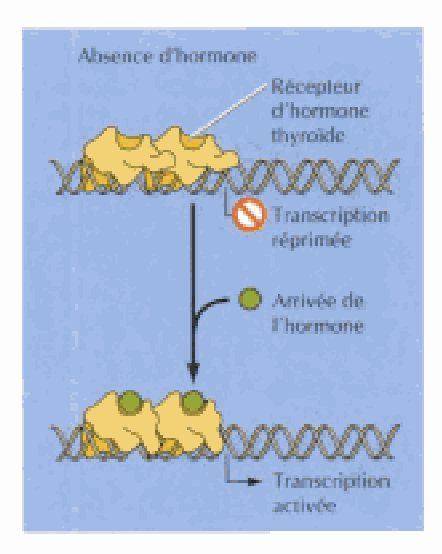


Figure 13.4
Régulation d'un gène par un récepteur d'hormone thyroïdienne. Le récepteur d'hormone thyroïdienne s'attache à l'ADN, que l'hormone soit présente ou absente, mais l'arrivée de l'hormone transforme la fonction répressive du récepteur sur la transcription du gène cible en une fonction stimulante.

lulaires exprimés par les cellules cibles, sensibles à ces hormones ; ces récepteurs, qu'on classe dans la grande **famille des récepteurs de stéroïdes**, sont des facteurs de transcription qui comportent des domaines apparentés, l'un pour séquestrer le ligand, un autre pour se fixer à l'ADN et un troisième pour activer la transcription. Comme la fixation de ces ligands les rend activateurs ou répresseurs de leur gène cible, on peut dire que les hormones stéroïdiennes et les molécules apparentées ajustent l'expression des gènes d'une manière directe.

Un ligand a un effet bien particulier selon le récepteur auquel il se fixe. Certains membres de la famille des récepteurs de stéroïdes, par exemple les récepteurs d'œstrogènes ou les récepteurs de glucocorticoïdes, ne s'attachent pas à l'ADN en l'absence d'hormone ; dès que l'hormone leur a imposé un changement de conformation, ces récepteurs se fixent aux séquences d'ADN régulatrices et activent la transcription du gène cible. Dans les autres cas, le récepteur s'attache à l'ADN, que l'hormone soit ou non présente, et c'est l'arrivée de l'hormone qui modifie l'activité régulatrice exercée par le récepteur sur la transcription du gène cible ; ainsi, le récepteur d'hormone thyroïdienne agit comme répresseur en l'absence d'hormone, mais dès qu'il a fixé l'hormone, il devient un activateur qui stimule la transcription des gènes sensibles à l'hormone thyroïdienne (figure 13.4).

Monoxyde d'azote

Un gaz comme le **monoxyde d'azote** (NO) est une importante molécule signalisatrice paracrine dans les système circulatoire, nerveux et immunitaire. Comme les hormones stéroïdiennes, NO peut diffuser directement à travers la membrane plasmique de sa cellule cible, mais il n'agit pas comme les stéroïdes, car au lieu de se fixer à un récepteur qui modifie la transcription, NO module l'activité de cibles qui sont des enzymes intracellulaires.

Le monoxyde d'azote est synthétisé à partir d'un acide aminé, l'arginine, par un enzyme appelé NO synthase (figure 13.5). Dès qu'il se forme, NO quitte la cellule productrice et agit dans le voisinage seulement, car sa grande instabilité ne lui laisse qu'une demi-vie de quelques secondes. Une action bien connue de NO est d'enclencher la dilatation des vaisseaux sanguins. Le processus commence par une libération de neuromédiateur, par exemple d'acétylcholine, aux terminaisons neuronales de la paroi des vaisseaux ; ces neuromédiateurs poussent la cellule endothéliale à synthétiser NO, qui diffuse ensuite dans les cellules musculaires lisses toutes proches, pour aller se fixer au fer du centre actif de la guanylyl cyclase. Celle-ci fonctionne plus vite et synthétise plus d'AMPc, le messager second (que nous décrirons plus loin dans ce chapitre) qui enclenche le relâchement des muscles lisses et, ce faisant, dilate les capillaires sanguins ; c'est ainsi que NO déclenche la dilatation des vaisseaux qui entraîne l'érection du pénis. Notons ici que l'utilisation de nitroglycérine en cardiologie s'explique par la conversion de la nitroglycérine en NO, qui va dilater les vaisseaux coronaires et améliorer l'irrigation du tissu cardiaque.

Arginine + O_2 + NADPH → (NOS) → Citrulline + NO (Monoxyde d'azote) + $NADP^+$

Figure 13.5
Synthèse du monoxyde d'azote. La synthase de monoxyde d'azote (NOS) catalyse la formation de monoxyde d'azote à partir d'arginine.

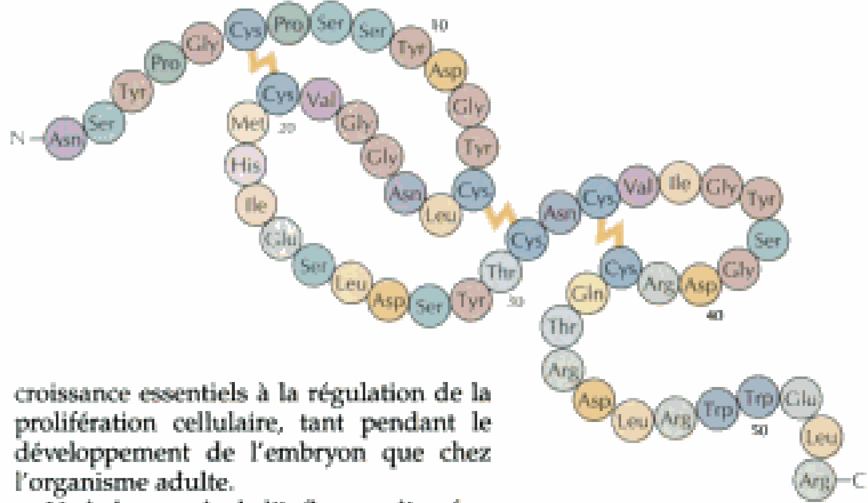


Figure 13.7
Structure du facteur de croissance épithélial (EGF). L'EGF comporte une seule chaîne polypeptidique de 53 résidus ; on y a indiqué les liaisons disulfure joignant les résidus cystéine. (D'après G. Carpenter et S. Cohen, 1979, *Ann. Rev. Biochem.* **48** :193).

croissance essentiels à la régulation de la prolifération cellulaire, tant pendant le développement de l'embryon que chez l'organisme adulte.

Un bel exemple de l'influence d'un facteur de croissance est celui qu'exerce le **facteur de croissance plaquettaire (PDGF)** sur la réparation des blessures. Le PDGF s'accumule dans les plaquettes sanguines et est libéré lors de la coagulation du sang, au niveau même de la lésion tissulaire ; il fait alors proliférer les fibroblastes au voisinage du caillot, ce qui va réparer le tissu endommagé. D'autres substances appartenant au grand groupe des facteurs de

Table 13.1 Exemples d'hormones peptidiques, de neuropeptides et de facteurs de croissance

Molécule-signal	Taille[1]	Fonctions[2]
Hormones peptidiques		
Insuline	A = 21, B = 30	Ajuste la prise de glucose ; stimule la prolifération cellulaire
Glucagon	29	Stimule la synthèse de glucose
Hormone de croissance	191	Stimule partout la croissance
Hormone folliculostimulante (FSH)	α = 92, β = 118	Stimule la croissance des ovocytes et des follicules ovariens
Prolactine	198	Stimule la production de lait
Neuropeptides et neurohormones		
Substance P	11	Transmission synaptique sensorielle
Ocytocine	9	Stimule la contraction des muscles lisses
Vasopressine	9	Stimule la réabsorption d'eau par le rein
Encéphalines	5	Analgésiques
Endorphine β	31	Analgésique
Facteurs de croissance		
Facteur de croissance neuronal (NGF)	118	Différenciation et survie des neurones
Facteur de croissance épithélial (EGF)	53	Prolifération de nombreux types cellulaires
Facteur de croissance plaquettaire (PDGF)	A = 125, B = 109	Prolifération des fibroblastes et d'autres types cellulaires
Interleukine-2	133	Prolifération des lymphocytes T
Erythropoïétine	166	Accroît la population de globules rouges

[1] La taille est donnée en nombre de résidus d'acide aminé. Certaines hormones et facteurs de croissance comportent deux chaînes polypeptidiques différentes, désignées A et B ou α et β.
[2] La plupart de ces hormones et de ces facteurs de croissance sont doués encore d'autres activités.

croissance polypeptidiques (les **cytokines**) ajustent la différenciation des cellules sanguines et modulent l'activité des lymphocytes pendant la réponse immunitaire. Au lieu d'être sécrétés dans le milieu extracellulaire, d'autres facteurs de croissance polypeptidiques (les **facteurs de croissance ancrés aux membranes**) restent associés à la membrane plasmique, agissant donc comme messagers directs entre cellules conjointes.

Puisque ni les hormones peptidiques, ni les neuropeptides ni les facteurs de croissance ne peuvent franchir la membrane plasmique de leur cellule cible, ils agissent en se fixant à des récepteurs de surface, un processus que nous aborderons plus loin dans ce chapitre. Comme le laisse présager le rôle clé joué par les facteurs de croissance polypeptidiques sur la prolifération cellulaire, il suffit d'un dérèglement du signal porté par les facteurs de croissance pour provoquer diverses maladies, notamment maintes espèces de cancer ; ainsi l'expression anormale d'un parent proche du récepteur d'EGF est une cause première dans l'apparition de nombreux cancers du sein et de l'ovaire chez la femme.

Icosanoïdes

Plusieurs sortes de lipides servent de molécules signalisatrices qui, contrairement aux hormones stéroïdiennes, agissent en se fixant à un récepteur logé à la surface cellulaire. Parmi ces molécules, les plus importantes sont des membres d'une classe de lipides appelés **icosanoïdes**, qui comprend les **prostaglandines**, la **prostacycline**, les **thromboxanes** et les **leucotriènes** (figure 13.8). Comme les icosanoïdes sont rapidement détruits, ils inter-

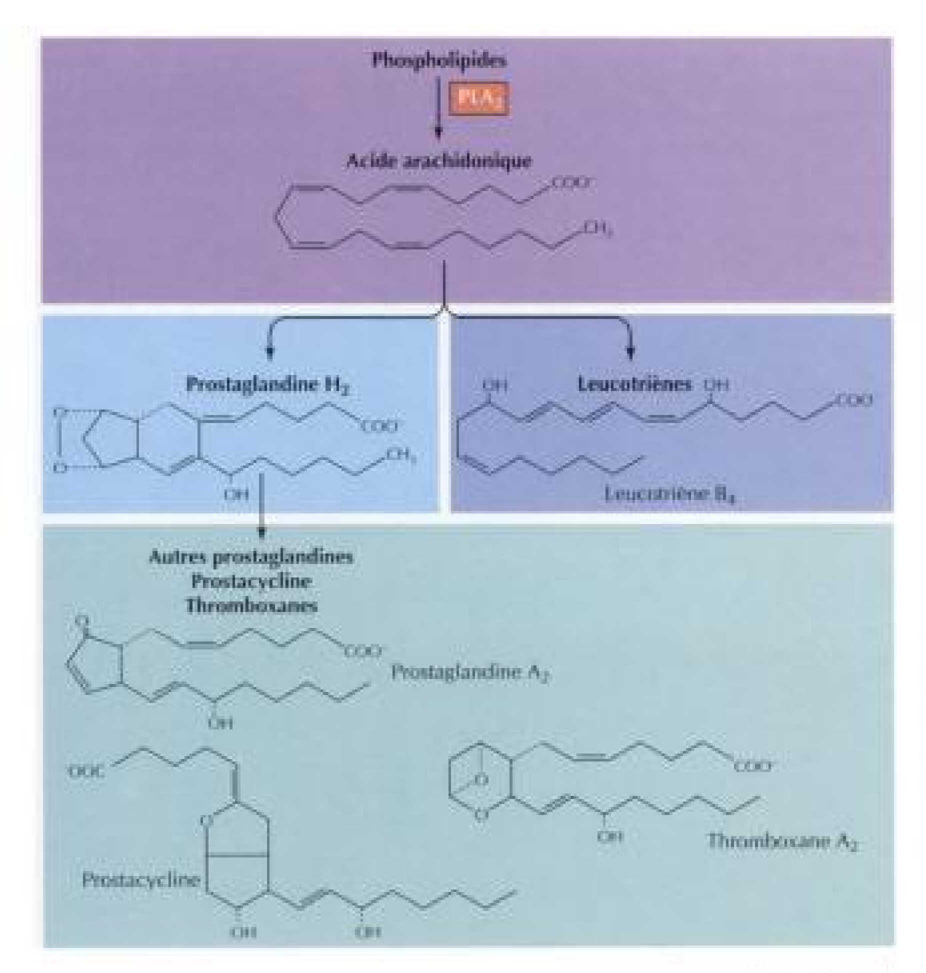


Figure 13.8
Synthèse et structure des icosanoïdes. Les icosanoïdes comprennent les prostaglandines, la prostacycline, les thromboxanes et les leucotriènes. Leur synthèse part de l'acide arachidonique, issu de l'hydrolyse des phospholipides par la phospholipase A_2 (PLA_2). L'arachidonate choisit alors deux voies ; l'une mène à la synthèse des prostaglandines, de la prostacycline et des thromboxanes, l'autre à la synthèse de leucotriènes.

viennent localement dans des voies de signalisation autocrines ou paracrines ; ils stimulent toutes sortes de réponses dans leurs cellules cible, notamment l'agrégation des plaquettes sanguines, l'inflammation tissulaire et la contraction des muscles lisses.

Tous les icosanoïdes sont synthétisés à partir d'acide arachidonique, dérivé, lui, des phospholipides. La première étape de la voie menant à la production de prostaglandines ou de thromboxanes est la conversion de l'arachidonate en prostaglandine H_2. Il est intéressant de remarquer que l'enzyme qui catalyse cette réaction (la prostaglandine synthase) est une cible de l'aspirine ainsi que des autres anti-inflammatoires non stéroïdiens. En inhibant la synthèse des prostaglandines, l'aspirine tempère l'inflammation et réduit la douleur ; en inhibant la synthèse de thromboxane, l'aspirine modère l'agrégation des plaquettes et l'intensité de la coagulation du sang. Pour cette raison, on prescrit souvent de l'aspirine à petites doses quotidiennes pour se prémunir contre les infarctus.

Hormones végétales

La croissance et le développement des plantes sont ajustés par une série de petites molécules appelées **hormones végétales**. La teneur d'une plante en ces petites molécules dépend notamment de l'intensité lumineuse et d'agents infectieux environnants ; aussi les hormones coordonnent-elles les réponses que les tissus des diverses parties de la plante donnent aux signaux de l'environnement.

On a l'habitude de grouper les hormones végétales en cinq classes : **auxines, gibbérellines, cytokinines, acide abscisique** et **éthylène** (figure 13.9). La première hormone végétale identifiée est l'auxine, que découvrirent les expériences pionnières de Charles Darwin dans les années 1880. Un de leurs effets est d'induire l'allongement des cellules végétales en ramollissant la paroi cellulosique (voir figure 12.49) ; en outre, les auxines gouvernent plusieurs étapes du développement de la plante, y compris la division et la différenciation des cellules. Les autres hormones végétales exercent aussi plusieurs effets sur leurs tissus cible, notamment l'allongement des tiges (gibbérellines), le mûrissement des fruits (éthylène), la mitose (cytokinines) et le début de la dormance (acide abscisique).

Acide gibbérellique
(une gibbérelline)

Acide indole-3-acétique
(une auxine)

Ethylène

Zéatine
(une cytokinine)

Acide abscisique

Figure 13.9
Structure des hormones végétales.

On comprend moins bien les mécanismes moléculaires de l'action des hormones végétales que les mécanismes correspondants chez l'animal, et on commence à peine à identifier et à caractériser les récepteurs d'hormones végétales. Un domaine où la quête du mécanisme d'action a été fructueuse est la sensibilité des plantes à l'éthylène. En utilisant la petite arabette *A. thaliana* comme modèle expérimental, on a identifié une partie des gènes essentiels à la réponse de la plante à l'éthylène ; parmi ces gènes, au moins un code un récepteur d'éthylène potentiel et au autre code une protéine apparentée à la protéine-kinase Raf qui joue un rôle clé dans les messageries animales (voir plus loin dans ce chapitre).

RÔLE DES RÉCEPTEURS PRÉSENTS À LA SURFACE DE LA CELLULE

Comme nous venons de le mentionner, la plupart des ligands qui portent un signal d'une cellule à une autre cellule (tels les neuromédiateurs, les hormones peptidiques et les facteurs de croissance) s'attachent à la surface de leurs cellules cible. Aussi, de nombreux chercheurs se sont-ils attaqués au domaine des messagers intercellulaires de façon à saisir par quel mécanisme les récepteurs superficiels transmettent les signaux reçus lors de la fixation d'un ligand. Comme on l'a vu au chapitre 12, certains récepteurs de neuromédiateur sont des tunnels à ions ouverts par le ligand, qui gouvernent le flux d'ions à travers la membrane plasmique, mais d'autres récepteurs superficiels, notamment les récepteurs d'hormone peptidique et les récepteurs de facteur de croissance, agissent en modifiant l'activité de certaines protéines intracellulaires ; ce sont alors ces protéines qui transmettent les signaux reçus du récepteur à une série d'autres cibles intracellulaires, parmi lesquelles on trouve souvent des facteurs de transcription. Dès qu'un ligand s'est fixé à un récepteur présent à la surface d'une cellule, se déclenche dans le cytoplasme une cascade de réactions qui finit par atteindre le noyau de la cellule cible et par reprogrammer l'expression des gènes. Nous abordons ici le fonctionnement des principales catégories de récepteurs superficiels, en laissant pour la prochaine section du chapitre l'étude des rouages intracellulaires qui portent les messages en aval du récepteur.

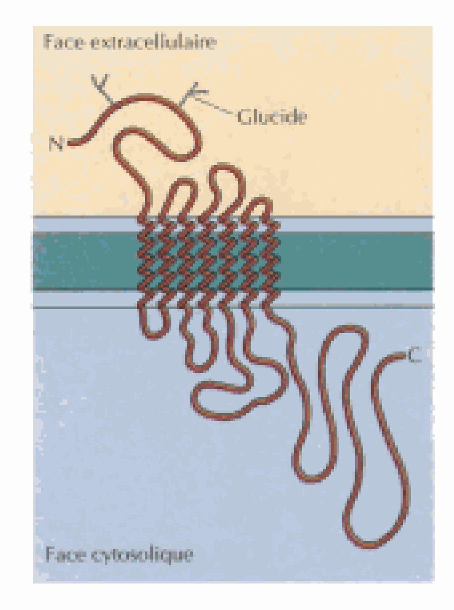
Récepteurs couplés à une protéine G

La plus grande famille de récepteurs superficiels transmet ses signaux à des cibles intracellulaires par le truchement de **protéines G**, des protéines qui séquestrent les nucléotides de guanine. On a identifié à présent plus d'un millier de ces **récepteurs couplés à une protéine G**, parmi lesquels ceux de nombreux neuromédiateurs, de neuropeptides et d'hormones peptidiques. La famille des récepteurs couplés à une protéine G comprend aussi un grand nombre de récepteurs siégeant à la surface des cellules de l'odorat, de la vue et du goût.

La parenté de structure et de fonction des récepteurs couplés à une protéine G réside dans le fait que ces protéines comportent sept hélices α transmembranaires (figure 13.10). La fixation de ligand au domaine extracellulaire de ces récepteurs y induit un changement de conformation qui permet au domaine cytosolique du récepteur de s'accoler à une protéine G portée par la face interne de la membrane plasmique. Cette interaction rend active la protéine G, qui quitte le récepteur et porte le signal à une cible intracellulaire, qui est soit un enzyme soit un tunnel à ions.

On découvrit l'existence des protéines G en étudiant les hormones (telle l'adrénaline) qui commandent la synthèse d'AMPc dans leurs cellules cible. Comme on le verra à la fin du chapitre, l'AMPc est un important messager second, acteur des réactions cellulaires à tout une série d'hormones. Dans les années '70, l'équipe de Martin Rodbell fit l'observation, cruciale, que le GTP est un élément essentiel de la stimulation hormonale de l'adénylyl cyclase (l'enzyme qui catalyse la formation d'AMPc) ; cette observation mena à la découverte qu'une protéine séquestrant un nucléotide de guani-

Figure 13.10
Structure d'un récepteur couplé à une protéine G. Les récepteurs couplés à une protéine G se caractérisent par leurs sept hélices α transmembranaires.



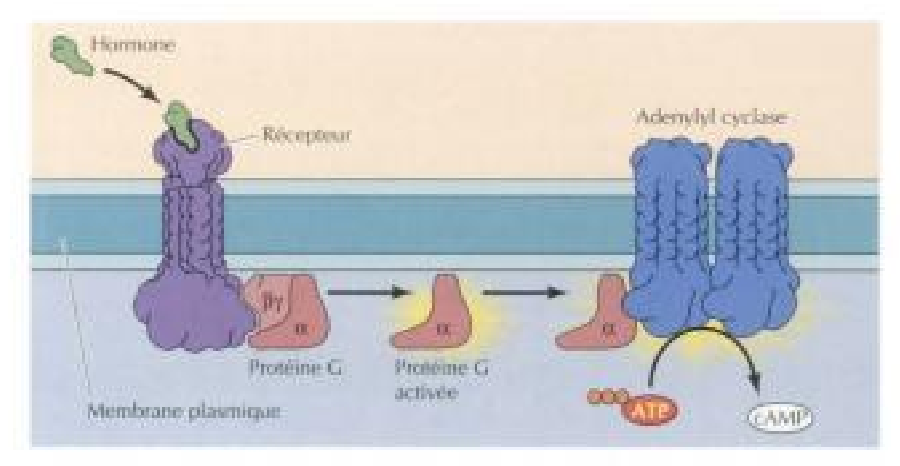


Figure 13.11
Activation de l'adénylyl cyclase par une hormone. L'attachement de l'hormone enclenche l'interaction du récepteur avec une protéine G. Le protomère α de la protéine G activée se dissocie alors du récepteur et stimule l'adénylyl cyclase, qui transforme l'ATP en AMPc.

ne (baptisée protéine G) sert d'intermédiaire à l'activation de l'adénylyl cyclase (figure 13.11). On a trouvé depuis lors maintes protéines G qui servent de commutateur physiologique pour ajuster l'activité de tout une série de cibles intracellulaires sensibles à des signaux extérieurs.

Une protéine G comporte trois protomères, désignés α, β et γ (figure 13.12) ; on les appelle souvent **protéines G hétérotrimériques**, pour les distinguer d'autres protéines fixant un nucléotide guanylique, telles les protéines Ras dont nous parlerons à la fin du chapitre. Le protomère α séquestre le nucléotide de guanine, qui détermine l'activité de la protéine G ; à l'état de repos, α est attaché à GDP, sous forme de complexe avec β et γ. En se fixant, l'hormone modifie la conformation du récepteur de telle façon que son domaine cytosolique, en entrant au contact de la protéine G, stimule le départ de GDP et son échange en faveur de GTP. Le protomère α devenu actif parce que chargé de GTP quitte alors les protomères β et γ, qui restent

Figure 13.12
Régulation des protéines G.

L'hydrolyse du GTP lié met fin à l'activité du protomère α, qui, chargé alors de GDP, se réassocie au complexe βγ.

À l'état inerte, le protomère α est chargé de GDP et forme un complexe avec β et γ.

Hydrolyse du GTP

Récepteur

Protéine G (inerte)

Hormone

Echange de nucléotides

Protéine G (état actif)

Protéines cible

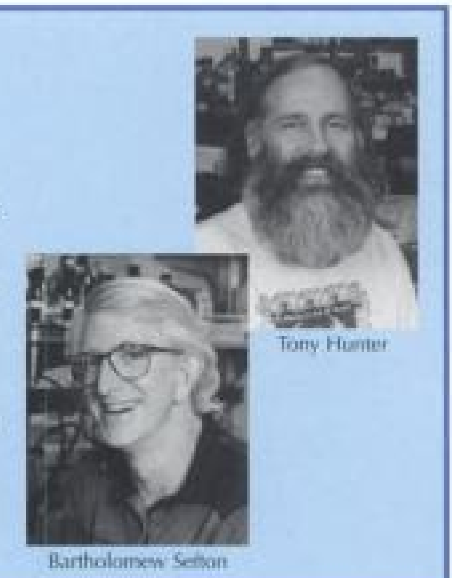
La fixation de l'hormone provoque l'interaction du récepteur avec une protéine G, ce qui stimule le remplacement de GDP par GTP.

Le protomère α chargé de GTP et le complexe des protomères βγ se dissocient du récepteur et entrent en contact avec leur cible.

La protéine-tyrosine kinase src (suite)

Portée de la découverte

La découverte du pouvoir qu'a Src de catalyser le transfert d'un groupe phosphoryle au résidu tyrosine de certaines protéines mit en évidence non seulement une activité protéine kinasique inconnue, mais démontra le lien entre cette activité et la régulation de la prolifération cellulaire. En démontrant, à la suite des découvertes de Sefton et Hunter, que nombre de protéines oncogènes virales fonctionnent aussi en tant que protéine-tyrosine kinase, on pouvait généraliser la relation qui existe entre la phosphorylation de résidus tyrosine protéiniques et la prolifération débridée des cellules cancéreuses. Le groupe de Stanley Cohen montra ensuite que le récepteur de EGF est une protéine-tyrosine kinase ; on savait alors que cette activité enzymatique entrait en jeu dans la commande de la prolifération normale des cellules. Les études ultérieures ont permis d'identifier, parmi les composants des messageries cellulaires, plusieurs autres protéine-tyrosine kinases, qui sont ou non des récepteurs. En étudiant le mécanisme d'une cancérisation d'origine virale chez le poulet, on a donc mis au jour une activité enzymatique inattendue, qui joue un rôle central dans les voies de signalisation régissant la prolifération et la différenciation des cellules animales.



Tony Hunter

Bartholomew Sefton

L'amorçage sur la plupart des récepteurs à activité de protéine-tyrosine kinase consiste en la dimérisation du récepteur qui a accueilli le ligand (figure 13.14). Certains facteurs de croissance, comme le NGF et le PDGF, sont eux-mêmes des dimères formés de chaînes polypeptidiques identiques ; en se fixant simultanément à deux molécules de récepteurs, ils en provoquent la dimérisation. D'autres facteurs de croissance, comme l'EGF, sont des monomères, mais posséderaient deux sites à récepteurs séparés capables de ponter les récepteurs ou d'induire des changements de conformation qui

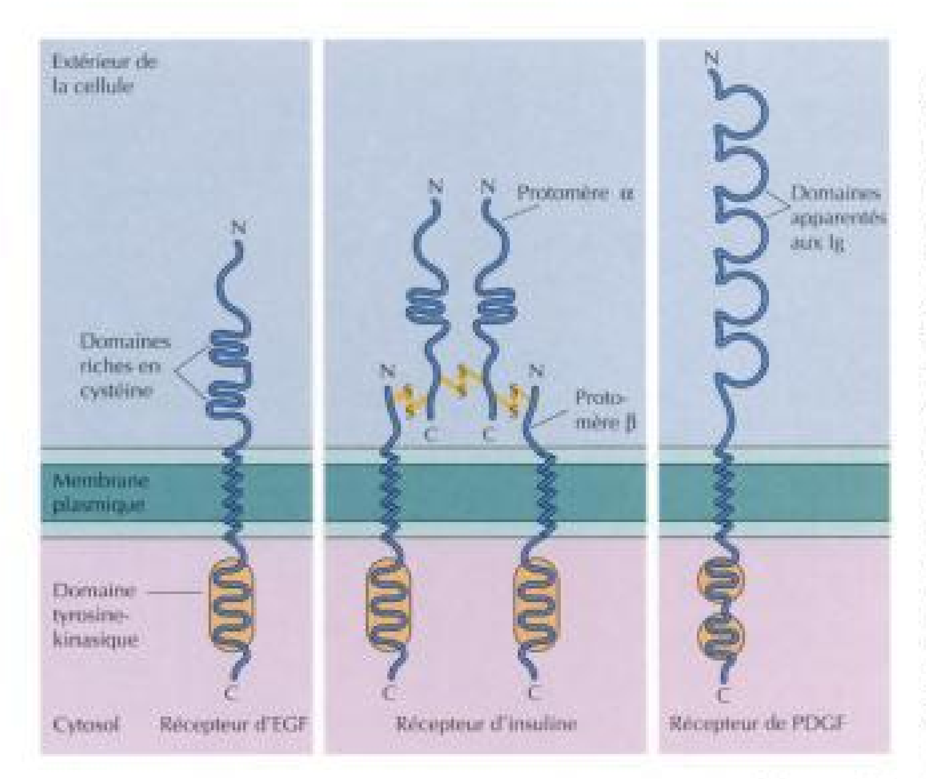


Figure 13.13
Structure d'un récepteur à activité de protéine kinase. Chaque récepteur comporte un domaine N-terminal extracellulaire destiné à recevoir le ligand, une unique hélice α transmembranaire et un domaine C-terminal possédant une activité de protéine-tyrosine kinase. Le schéma montre la structure de trois familles de récepteur à activité de protéine-tyrosine kinase. Le récepteur d'insuline et le récepteur d'EGF comportent tous deux un domaine extracellulaire riche en cystéine, tandis que le récepteur de PDGF comporte un domaine apparenté à celui des immunoglobulines (Ig). Le récepteur de PDGF se caractérise aussi par le fait que son domaine kinasique est scindé par un intercalaire de près d'une centaine de résidus sans rapport avec ceux présents dans le domaine catalytique des autres protéine-tyrosine kinases. Le récepteur d'insuline se singularise par le fait qu'il est un dimère d'une couple de chaînes polypeptidiques.

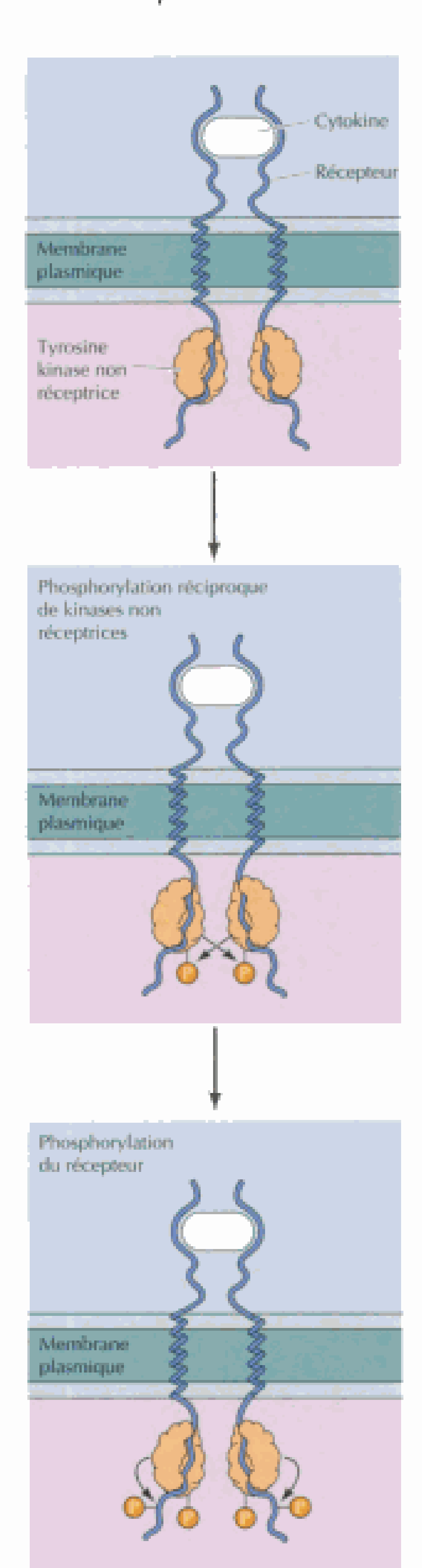


Figure 13.17
Messagerie propre aux récepteurs de cytokines. La capture d'un ligand provoque la dimérisation du récepteur et induit l'activation, par phosphorylation réciproque, d'une protéine-tyrosine kinase dépourvue d'activité réceptrice. Les kinases activées phosphorylent ensuite des résidus tyrosine du récepteur, en générant des sites de fixation pourvus de phosphotyrosine, que reconnaîtront des molécules signal placées en aval sur la voie de signalisation.

cytokine, ce qui montre que les membres de la famille JAK remplissent une tâche essentielle en couplant ces récepteurs à la phosphorylation de tyrosines dans les cibles intracellulaires. Par contre, les membres de la famille Src sont indispensables dans les voies signalisatrices partant de récepteurs d'antigènes présents sur les lymphocytes B et T, mais ne seraient pas nécessaires à la transmission des signaux issus de la plupart des récepteurs de cytokines.

Récepteurs liés à d'autres activités enzymatiques

Si la majorité des récepteurs liés à un enzyme stimulent la phosphorylation d'une tyrosine protéinique, il existe des récepteurs associés à d'autres activités enzymatiques, notamment des protéine-tyrosine phosphatases, des protéine-sérine/thréonine kinases et des guanylyl cyclases. On connaît le fonctionnement de ces récepteurs beaucoup moins bien que celui des récepteurs couplés aux protéines G ou que celui des récepteurs associés à une activité de protéine-tyrosine kinase.

Une **protéine-tyrosine phosphatase** enlève le groupe phosphate aux résidus phosphotyrosyle, et contrecarre l'action d'une protéine-tyrosine kinase ; dans la plupart des cas, ces phosphatases jouent un rôle régulateur tampon, puisqu'elles mettent fin au signal émis par la phosphorylation d'une tyrosine protéinique. Cependant, certaines protéine-tyrosine phosphatases sont des récepteurs superficiels dont l'activité enzymatique joue un rôle positif dans les messageries cellulaires. Un bon exemple en est un récepteur appelé CD45, porté par la surface des lymphocytes B et des lymphocytes T. Dès la rencontre d'un antigène, CD45 semble déphosphoryler une phosphotyrosine singulière qui inhibe l'activité enzymatique des membres de la famille Src ; la protéine-tyrosine phosphatase CD45 sert donc, assez paradoxalement, à stimuler des protéine-tyrosine kinases dépourvues d'activité réceptrice.

Les récepteurs de **facteurs de croissance transformants** β **(TGF-β)** et de polypeptides apparentés sont des protéine kinases qui phosphorylent un résidu de sérine ou de thréonine, et non de tyrosine, de leur substrat protéique. Le TGF-β est le prototype d'une famille de facteurs de croissance polypeptidiques qui gouvernent la prolifération et la différenciation de divers types cellulaires, habituellement en freinant la multiplication de leurs cellules cible. En clonant le premier récepteur d'un membre de la famille TGF-β en 1991, on s'aperçut qu'il est le prototype d'une singulière famille de récepteurs, à savoir un de ceux qui possèdent un domaine doué d'activité de **protéine-sérine/thréonine kinase** ; on a découvert depuis lors plusieurs membres de la famille TGF-β doués de la même activité enzymatique. La fixation du ligand à ces récepteurs enclenche l'association de deux chaînes polypeptidiques différentes, codées par des membres différents de la famille TGF-β, en donnant un hétérodimère dans lequel les kinases du récepteur se phosphorylent l'une l'autre. On connaît encore très mal les molécules signalisatrices qui agissent en aval des récepteurs de la famille TGF-β.

Certains ligands peptidiques s'attachent à des récepteurs dont un domaine cytosolique est une guanylyl cyclase qui catalyse la formation de GMPc. Rappelons que le monoxyde d'azote agit aussi en stimulant la guanylyl cyclase, mais la cible du monoxyde d'azote est non pas un récepteur transmembranaire mais un enzyme intracellulaire. Les **récepteurs à activité de guanylyl cyclase** comportent un domaine extracellulaire pour accueillir le ligand, une unique hélice α transmembranaire et un domaine cytosolique porteur

composé de deux protomères catalytiques et de deux protomères régulateurs (figure 13.19). L'AMPc s'attache aux protomères régulateurs et les fait se dissocier des protomères catalytiques ; une fois libres, ces protomères catalytiques sont actifs et capables de phosphoryler certains résidus sérine de leurs protéines cible.

Dans la régulation du métabolisme du glycogène, la protéine kinase A phosphoryle deux cibles enzymatiques primordiales (figure 13.20). La première est une autre protéine kinase, qui devient active dès qu'elle est phosphorylée par la protéine kinase A ; à son tour, cette phosphorylase kinase phosphoryle et met en marche la glycogène phosphorylase, qui catalyse la dépolymérisation du glycogène en glucose 1-phosphate. De plus, la protéine kinase A phosphoryle un enzyme appelé glycogène synthase, qui catalyse la synthèse de glycogène ; dans ce cas, cependant, la phosphorylation abolit l'activité enzymatique. En même temps qu'elles accroissent la dépolymérisation du glycogène, l'augmentation du taux d'AMPc et l'activation de la protéine kinase A empêchent donc toute synthèse future de glycogène.

La chaine de réactions menant du récepteur d'adrénaline à la glycogène phosphorylase illustre bien le concept d'amplification de signal au cours de la transduction d'un signal à travers le cytoplasme. Chaque molécule d'adrénaline active une seule molécule de récepteur, mais chacune de ces dernières arrive à activer jusqu'à une centaine de molécule de G_s. Chaque molécule de G_s stimule l'activité enzymatique de l'adénylyl cyclase, qui, elle, catalyse la formation de nombreuses molécules d'AMPc. L'amplification du signal continue à mesure que chaque molécule de protéine kinase A phosphoryle beaucoup de molécules de phosphorylase kinase, qui à leur tour phosphoryleront un grand nombre de molécules de glycogène phosphorylase. La fixation d'hormone à quelques récepteurs suffit donc à activer un grand nombre d'enzymes cibles intracellulaires.

Dans maintes cellules animales, la montée du taux d'AMPc enclenche la transcription de gènes cibles particuliers pourvus de la séquence baptisée

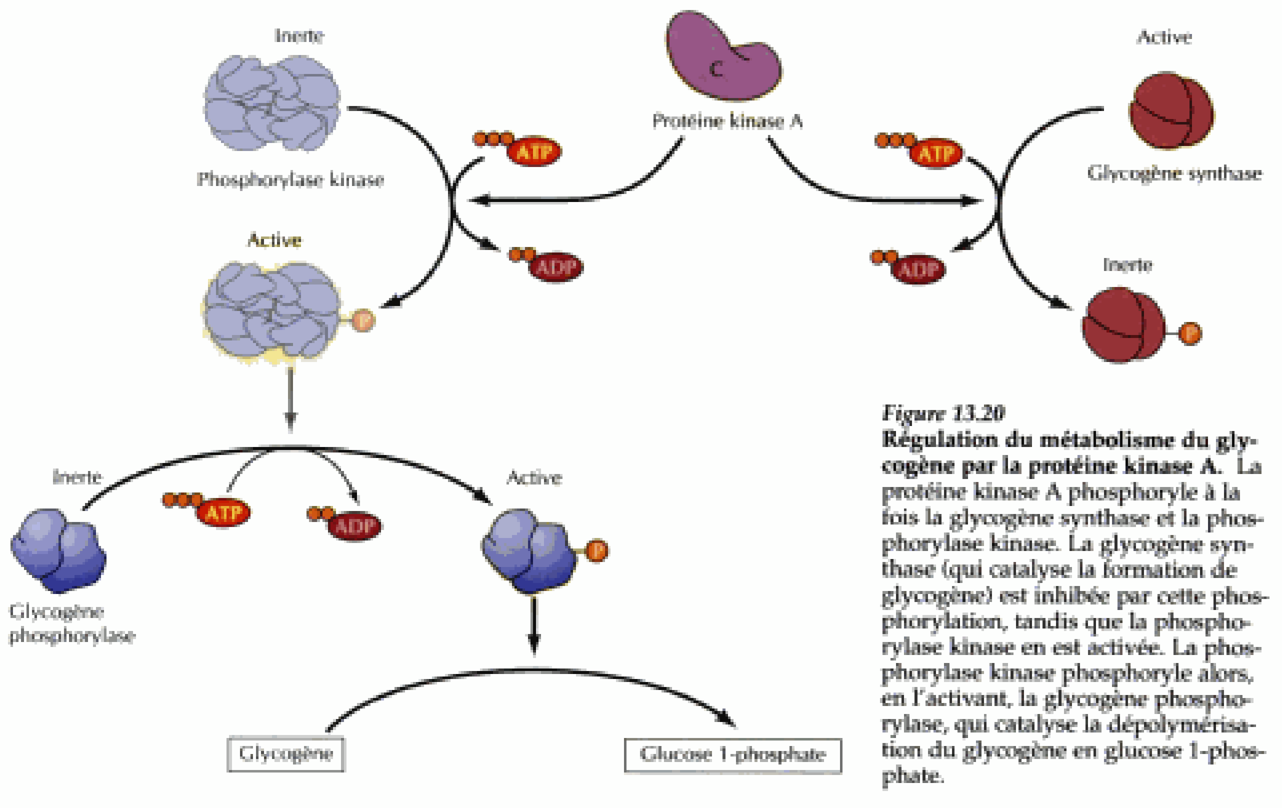


Figure 13.20
Régulation du métabolisme du glycogène par la protéine kinase A. La protéine kinase A phosphoryle à la fois la glycogène synthase et la phosphorylase kinase. La glycogène synthase (qui catalyse la formation de glycogène) est inhibée par cette phosphorylation, tandis que la phosphorylase kinase en est activée. La phosphorylase kinase phosphoryle alors, en l'activant, la glycogène phosphorylase, qui catalyse la dépolymérisation du glycogène en glucose 1-phosphate.

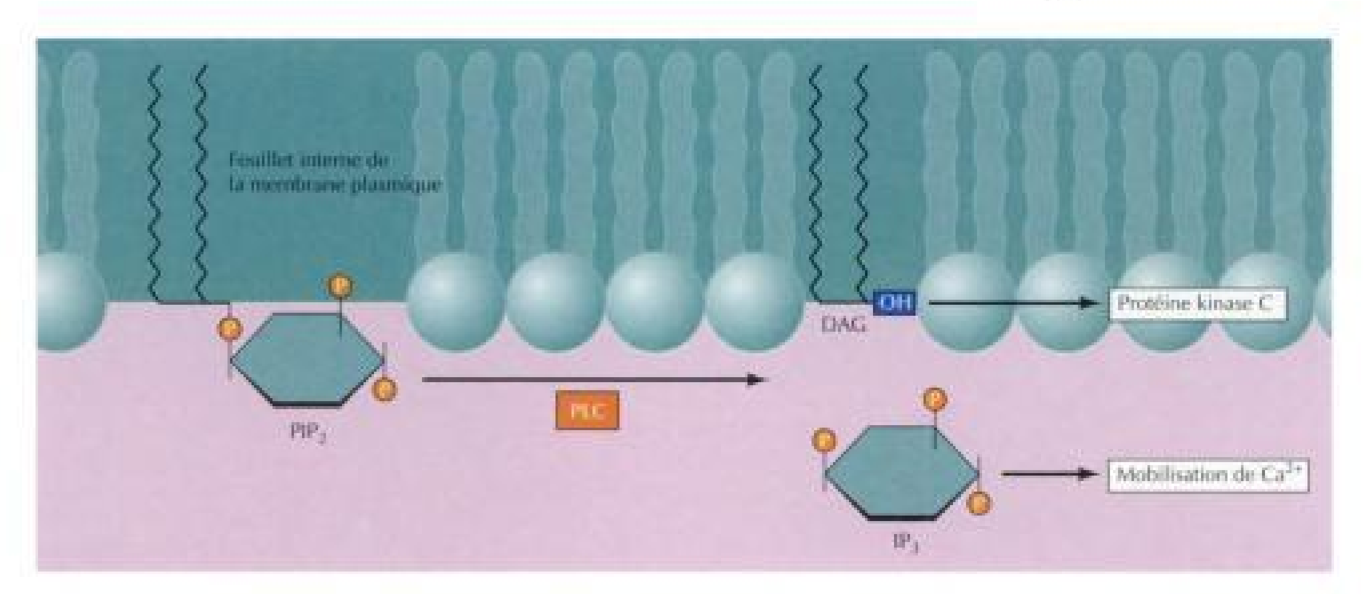


Figure 13.24
Hydrolyse de PIP$_2$. La phospholipase C catalyse l'hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5-*bis*phosphate (PIP$_2$) en diacylglycérol (DAG) et inositol *tris*phosphate (IP$_3$). Le diacylglycérol active des membres de la famille de la protéine kinase C et IP$_3$ enclenche la fuite d'ions Ca^{2+} des réserves intracellulaires.

de croissance stimulent l'hydrolyse de PIP$_2$ par la **phospholipase C**, une réaction qui produit deux messagers seconds, à savoir, le **diacylglycérol** et l'**inositol 1,4,5-*tris*phosphate (IP$_3$)** (figure 13.24). Diacylglycérol et inositol 1,4,5-*tris*phosphate stimulent chacun sa propre voie aval, respectivement la protéine kinase C et la mobilisation de Ca^{2+}. L'hydrolyse de PIP$_2$ met donc en branle deux voies parallèles de cascades de signalisation intracellulaire.

Retenons bien que l'hydrolyse de PIP$_2$ est activée tant en aval des récepteurs couplés à une protéine G qu'en aval des protéine-tyrosine kinases. Ceci est dû à ce qu'une forme de phospholipase C (PLC-β) est stimulée par les protéines G tandis qu'une autre (PLC-γ) possède des domaines SH2 qui la font s'attacher aux récepteurs protéine-tyrosine kinasiques activés (figure 13.25) ; cette interaction entraîne PLC-γ dans la membrane plasmique ainsi que la phosphorylation de certaines de ses tyrosines, qui accroît son activité catalytique.

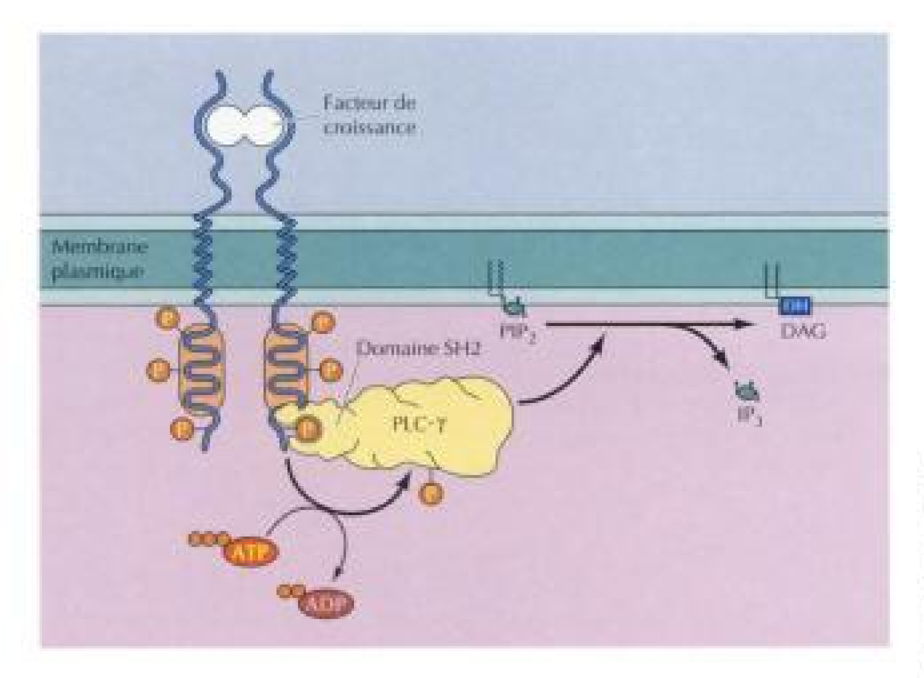


Figure 13.25
Activation de la phospholipase C par des protéine-tyrosine kinases. Le protomère γ de la phospholipase C (PLC-γ) se fixe par ses domaines SH2 à des protéine-tyrosine kinases réceptrices activées. La phosphorylation des tyrosine accroît l'activité de PLC-γ, ce qui accélère l'hydrolyse de PIP$_2$.

Figure 13.26
Formule d'un ester de phorbol. Du fait de leur ressemblance avec le diacyglycérol, les esters de phorbol stimulent la protéine kinase C.

Le diacylglycérol produit par l'hydrolyse de PIP_2 met en marche des protéine-sérine/thréonine kinases de la famille des **protéine kinases C**, parmi lesquelles beaucoup tiennent une place importante dans la commande de la prolifération et de la différenciation cellulaires. Ce rôle d'une protéine kinase C est illustré par l'influence des **esters de phorbol** (figure 13.26), souvent étudiés parce qu'ils enclenchent l'apparition de tumeurs chez l'animal. Cette action promotrice de tumeurs, manifestée par les esters de phorbol, est due à leur pouvoir de stimuler la protéine kinase C, à cause de leur ressemblance structurale avec le diacylglycérol. La protéine kinase C active à son tour d'autres cibles intracellulaires, comme la cascade de protéine kinases appelée voie des kinases MAP (exposée dans la section suivante), qui aboutit à une phosphorylation de facteurs de transcription, à des modifications de l'expression génique et à une stimulation de la prolifération cellulaire.

Une autre cible des signaux transmis par la protéine kinase C est le facteur de transcription **NF-κB**, impliqué dans plusieurs mécanismes de défense immunitaire. L'activité de NF-κB dépend de son transfert au noyau (figure 13.27). À l'état inerte, NF-κB est maintenu dans le cytoplasme sous forme de complexe avec un protomère inhibiteur appelé **IκB** ; l'activation de la protéine kinase C mène indirectement à la phosphorylation de IκB, qui résulte en sa destruction protéolytique. La disparition de IκB permet à NF-κB de passer dans le noyau, où il va moduler la transcription de ses gènes cible.

Pendant que le diacylglycérol reste associé à la membrane plasmique, l'autre messager second produit par hydrolyse de PIP_2, la petite molécule polaire IP_3, passe dans le cytosol, où elle provoque la libération de Ca^{2+} de ses réserves intracellulaires (figure 13.28). Comme on l'a mentionné au chapitre 12, la teneur en ions calcium du cytosol est ajustée à un niveau très bas (à peu près 0,1 μM) grâce à des pompes à Ca^{2+} qui rejettent activement Ca^{2+} hors de la cellule. Les ions Ca^{2+} sont pompés non seulement à travers la membrane plasmique, mais aussi dans le réticulum endoplasmique, qui sert de ce fait de réserve intracellulaire d'ions Ca^{2+}. IP_3 fait sortir Ca^{2+} du réticulum endoplasmique en se fixant à des récepteurs qui sont des tunnels à Ca^{2+} activés par un ligand ; en conséquence, le taux cytosolique de Ca^{2+} s'élève jusqu'à environ 1 μM, ce qui modifie l'activité de tout une série de protéines cible, notamment des protéine kinases et des protéine phosphatases. On sait, par exemple, que certains membres de la famille des protéine kinases C ne sont actifs qu'en présence d'ions Ca^{2+} et de diacylglycérol ; cela montre que ces protéine kinases sont assujetties aux deux branches de la voie de signalisation enclenchée par PIP_2.

Une bonne part des effets de Ca^{2+} s'exercent par le truchement d'une protéine avide d'ions calcium, la **calmoduline**, activée par séquestration d'ions Ca^{2+} dès que leur concentration atteint à peu près 0,5 μM (figure 13.29). La calmoduline chargée de Ca^{2+} va s'attacher à tout une série de protéines cible, parmi lesquelles des protéine kinases. Un type de protéine kinase asservie à la calmoduline/Ca^{2+} est la kinase des chaînes légères de myosine, qui déclenche la contraction du système actine-myosine en phosphorylant une

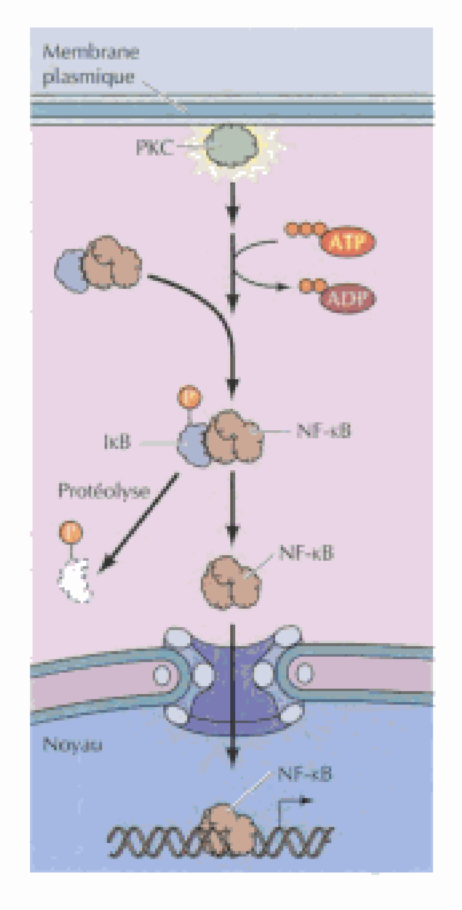


Figure 13.27
Activation de NF-κB. Sous forme de complexe avec IκB, NF-κB reste dans le cytoplasme et n'a pas d'activité. Quand la protéine kinase C est stimulée, IκB est indirectement phosphorylé, ce qui enclenche sa destruction protéolytique. Ceci permet à NF-κB de gagner le noyau et d'y gouverner l'expression de ses gènes cible.

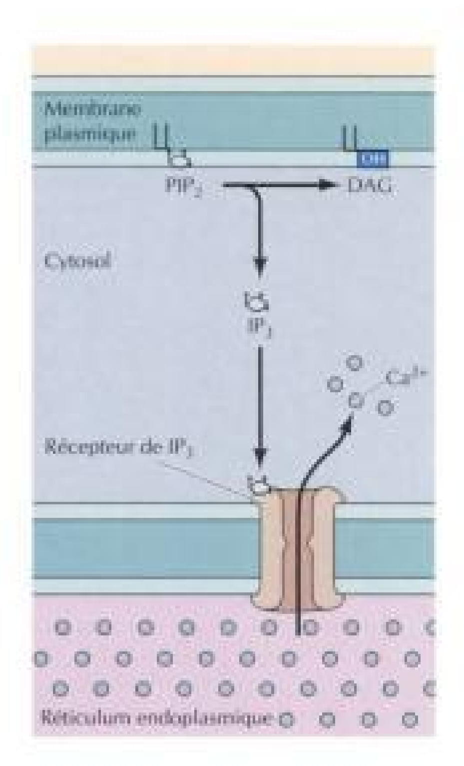


Figure 13.28
Mobilisation de Ca^{2+} par IP_3. Les ions Ca^{2+} sont continuellement pompés du cytosol dans le réticulum endoplasmique, pour constituer une réserve intracellulaire de Ca^{2+}. IP_3 s'attache à des récepteurs de la membrane du réticulum endoplasmique qui sont des tunnels à Ca^{2+} commandés par un ligand ; il s'ensuit un afflux d'ions Ca^{2+} vers le cytosol.

des chaînes légères de myosine (voir figure 11.28). Parmi les autres protéine kinases de ce type, on trouve des membres de la famille **CaM kinase II**, qui phosphoryle une variété de protéines, notamment des enzymes du métabolisme, des tunnels à ions et des facteurs de transcription. Une forme de CaM kinase II est particulièrement abondante dans le système nerveux ; elle y module la synthèse et la libération des neuromédiateurs. La CaM kinase II peut aussi moduler l'expression génique en phosphorylant certains facteurs de transcription. Notons qu'un des facteurs de transcription phosphorylé par la CaM kinase II n'est autre que CREB, qui est phosphorylé (on l'a mentionné précédemment) au même site par la protéine kinase A. Cette phosphorylation de CREB illustre l'un des nombreux cas de convergence où la voie de signalisation régie par Ca^{2+} rejoint celle régie par l'AMPc. Comme autres exemples, citons la régulation des adénylyl cyclases et phosphodiestérases par la calmoduline/Ca^{2+}, la régulation des tunnels à Ca^{2+} par l'AMPc et la phosphorylation de tout une série de protéines cible tant par la protéine kinase A que par des protéine kinases asservies à la calmoduline/Ca^{2+}. On s'aperçoit donc que, pour orchestrer un grand nombre de réponses cellulaires, la transmission de signaux *via* l'AMPc est coordonnée à celle qui utilise Ca^{2+}.

L'ion Ca^{2+} est un messager second très employé ; aussi est-il bon de noter que la fuite de Ca^{2+} du réticulum endoplasmique enclenchée par IP3 n'est pas le seul mécanisme capable d'augmenter la concentration intracellulaire de Ca^{2+}. Une autre voie met en jeu un flux entrant d'ions Ca^{2+} extracellulaires à travers des tunnels à Ca^{2+} de la membrane plasmique. Dans beaucoup de cellules, le pulse de Ca^{2+} produit dans le cytosol par IP_3 est suivi par une montée prolongée du taux de Ca^{2+} due à l'arrivée de Ca^{2+} du milieu extracellulaire ; cette fourniture de Ca^{2+} par le milieu extracellulaire est particulièrement cruciale pour les cellules électriquement excitables du nerf et du muscle, dans lesquelles les tunnels voltaïques à Ca^{2+} de la membrane plasmique s'ouvrent à chaque dépolarisation membranaire (figure 13.30). L'afflux de Ca^{2+} dans le cytosol déclenche une libération supplémentaire de Ca^{2+} des réserves intracellulaires, due à l'activation d'autres tunnels à Ca^{2+} désignés **récepteurs de type ryanodine**. Dans le neurone, cet afflux d'ions Ca^{2+} provoque la libération de neuromédiateurs ; l'ion Ca^{2+} joue donc un rôle clé dans la conversion du signal électrique en signal chimique dans le

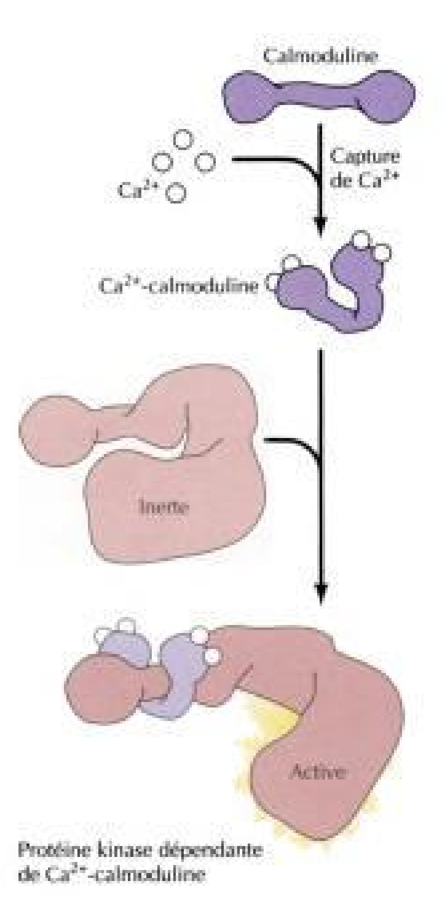


Figure 13.29
Rôle de la calmoduline. La calmoduline est une protéine en forme de massue, pourvue de quatre sites de séquestration de Ca^{2+}. Le complexe Ca^{2+}-calmoduline s'attache à diverses protéines cible, notamment à des protéine kinases dépendantes de Ca^{2+}.

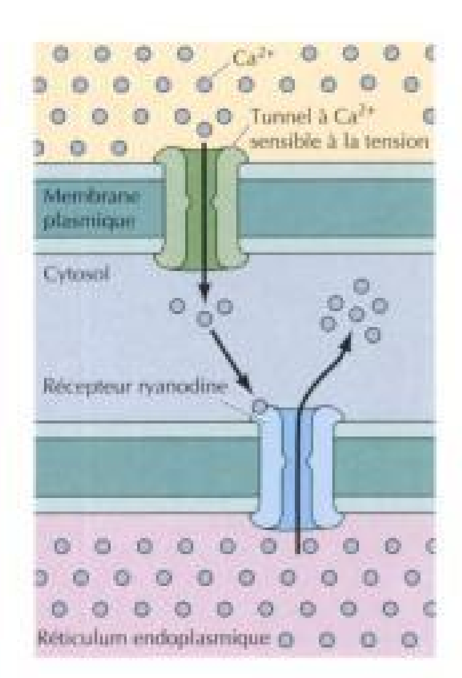


Figure 13.30
Régulation du taux intracellulaire de Ca^{2+} dans les cellules électriquement excitables. La dépolarisation membranaire enclenche l'ouverture des tunnels voltaïques à Ca^{2+} siégeant dans la membrane plasmique, entraînant l'afflux de Ca^{2+} du milieu extracellulaire. Le taux accru de Ca^{2+} dans le cytosol déclenche une libération d'ions Ca^{2+} des réserves intracellulaires, en ouvrant d'autres tunnels à Ca^{2+} (récepteurs de type ryanodine) portés par la membrane du réticulum endoplasmique. Dans les cellules musculaires, les récepteurs ryanodine du réticulum sarcoplasmique s'ouvrent aussi directement sur commande à chaque dépolarisation membranaire.

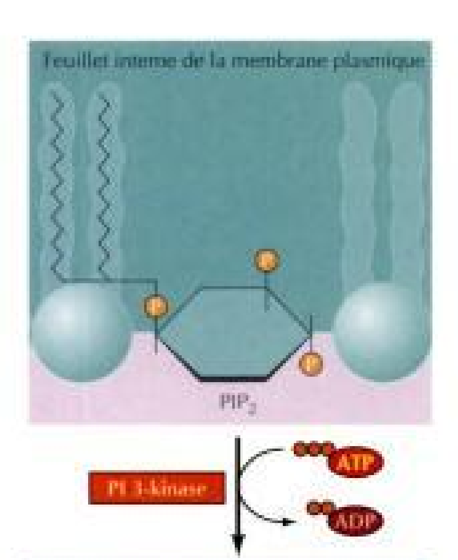
système nerveux. Dans la cellule musculaire, les ions Ca^{2+} s'accumulent dans le réticulum sarcoplasmique et en sont libérés par ouverture des récepteurs de type ryanodine, en réponse à une fluctuation du potentiel membranaire. Ce prélèvement dans les réserves provoque une montée importante du taux de Ca^{2+} dans le cytosol, qui déclenche la contraction du myocyte (voir chapitre 11). La cellule utilise donc toutes sortes de mécanismes pour ajuster la concentration en Ca^{2+} de son cytosol, et on s'aperçoit que Ca^{2+} est un messager second très polyvalent dans la commande de tout une série de processus cellulaires.

Si l'hydrolyse de PIP_2 amorce l'une des mieux connues parmi les voies de signalisation phospholipidiques, il existe d'autres importants messagers secondaires d'origine phospholipidique. En effet, outre qu'il est scindé par la phospholipase C, PIP_2 peut être phosphorylé sur la position 3 de l'inositol par la **phosphatidylinositide (PI) 3-kinase** (figure 13.31). Comme il arrive à la phospholipase C, une forme de PI 3-kinase est activée par des protéines G, une autre, parce qu'elle possède des domaines SH2, est mise en marche dès qu'elle s'attache à des protéine-tyrosine kinases faisant fonction de récepteur. La phosphorylation de PIP_2 produit du **phosphatidylinositol 3,4,5-*tris*phosphate (PIP_3)**, qui tiendrait un autre rôle de messager second. Bien que ses cibles soient encore mal connues, il semble que PIP_3 stimule des protéine kinases, éventuellement des membres de la famille des protéine kinases C ainsi qu'une protéine-sérine/thréonine kinase appelée Akt.

D'autres phospholipides sont également la source de messagers seconds. Accélérée par l'intervention de divers facteurs de croissance, l'hydrolyse de la phosphatidylcholine est, comme PIP_2, une source de diphosphatidylglycérol ; alors que l'hydrolyse de PIP_2 est une réponse ponctuelle à la présence d'un facteur de croissance, celle de phosphatidylcholine dure plusieurs heures, source prolongée de diacylglycérol qui serait nécessaire pour les réactions durables, comme la prolifération de la cellule. On sait que la sphingomyéline est clivée aussi, en réponse à divers stimuli intracellulaires, pour donner un céramide ; sa cible est inconnue, mais plusieurs arguments expérimentaux tendent à prouver que les céramides sont aussi des régulateurs intracellulaires de la prolifération et de la différenciation.

Ras, Raf et la voie de la MAP kinase

La voie de la MAP kinase désigne une cascade de protéine kinases, longuement conservée au cours de l'évolution, qui jouent un rôle central dans la transduction de signaux dans les cellules d'eucaryote, des levures aux humains. Les éléments centraux de cette voie sont une famille de protéine-sérine/thréonine kinases appelées **MAP kinases** (pour *mitogen-activated protein* kinases), mises en branle par une série de facteurs de croissance ou d'autres molécules signal. Chez les levures, les voies de la MAP kinase gouvernent diverses réponses cellulaires, notamment la conjugaison, la sporulation et la forme de la cellule. Chez les eucaryotes supérieurs (y compris



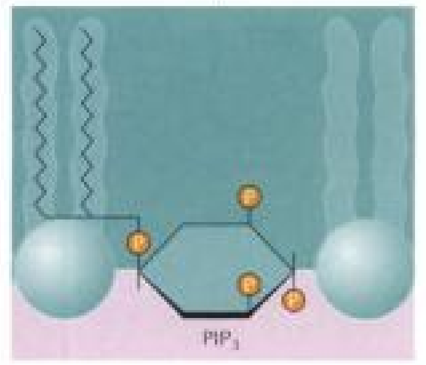


Figure 13.31
Rôle de la PI 3-kinase. En phosphorylant la position 3 de l'inositol, la PI 3-kinase transforme PIP_2 en PIP_3.

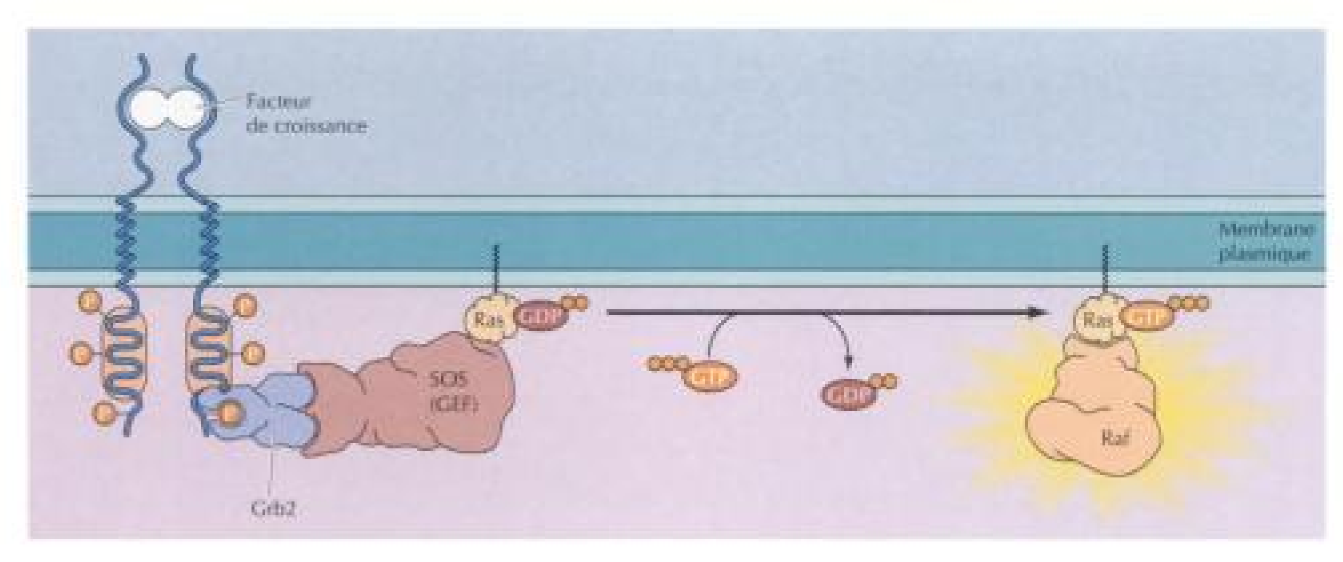


Figure 13.34
Activation de Ras en aval des récepteurs à activité de protéine-tyrosine kinase. Le complexe formé de Grb2 et de l'échangeur de nucléotides guanyliques Sos s'attache à la séquence à phosphotyrosine du récepteur activé *via* le domaine SH2 de Grb2. Cette interaction pousse Sos dans la membrane plasmique, où il stimulera un échange GDP/GTP dans Ras. Le complexe Ras-GTP activé va ensuite se fixer sur la protéine kinase Raf.

Rab) sert à ajuster le trafic vésiculaire, comme on l'a décrit au chapitre 9 ; d'autres petites protéines chargées de GTP interviennent dans le transfert des protéines au noyau (la protéine Ran décrite au chapitre 8) et dans la structuration du cytosquelette (la branche Rho décrite plus loin dans ce chapitre).

Le mode le mieux connu d'activation de Ras met en jeu des récepteurs à activité de protéine-tyrosine kinases (figure 13.34). Leur autophosphorylation les poussent à s'associer à des facteurs Ras d'échange de nucléotides guanyliques, à la suite d'interactions entre protéines pourvues de domaines SH2 ; un cas bien connu est celui du facteur d'échange de nucléotides guanyliques Sos attaché à Grb2, une protéine pourvue d'un domaine SH2 qui réside dans le cytosol des cellules non stimulées. La phosphorylation d'une tyrosine des récepteurs (ou de protéines associées aux récepteurs) génère un site de fixation pour les domaines SH2 de Grb2 ; dès que Grb2 s'est associé aux récepteurs activés, Sos gagne la membrane plasmique, où il peut entrer en contact avec les protéines Ras, ancrées au feuillet interne de la membrane plasmique par des lipides liés au bout carboxyle de Ras (voir figure 12.10). À ce moment, Sos induit l'échange de nucléotides guanyliques, qui produit un complexe Ras-GTP actif. C'est sous cette forme active que Ras entre en interaction avec ses effecteurs protéiques, notamment la protéine-sérine/thréonine kinase Raf ; notons que cette interaction avec Ras ne stimule pas directement l'activité catalytique de Raf, mais fait passer Raf du cytosol à la membrane plasmique, où Raf va être activé par d'autres signaux, dont vraisemblablement une phosphorylation par d'autres protéine kinases arrimées à la membrane plasmique.

Rappelons que Raf met en marche une cascade de protéine kinases aboutissant à l'activation de ERK ; ce dernier phosphoryle alors une série de protéines cible, dont la phospholipase A_2 (qui catalyse la formation d'acide arachidonique ; voir figure 13.8) et d'autres protéine kinases. Il est important de noter que certaines molécules de ERK sont transférées dans le noyau, où elles modulent, par phosphorylation, le fonctionnement de plusieurs facteurs de transcription (figure 13.35). À cet égard, il faut retenir que la première réponse à la stimulation par les facteurs de croissance est la rapide

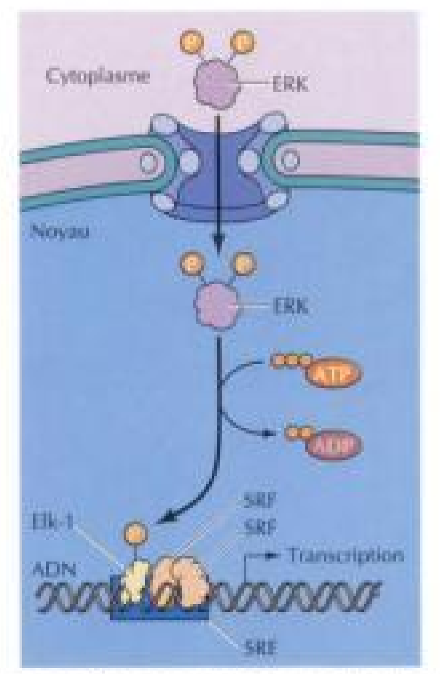
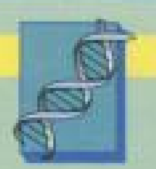


Figure 13.35
Induction des gènes précoces immédiats par ERK. Une fois activé, ERK gagne le noyau où il phosphoryle le facteur de transcription Elk-1. Celui-ci s'attache à l'élément sensible au sérum (SRE) sous forme de complexe avec le facteur sensible au sérum (SRF). Cette phosphorylation stimule l'activité de Elk-1 en tant que facteur de transcription, ce qui met en marche les gènes précoces immédiats.

MÉDECINE MOLÉCULAIRE



Cancer, transduction de signal, et oncogènes ras

Pathogénie

On doit au cancer la mort d'à peu près une personne sur quatre aux Etats-Unis, soit 500 000 décès par an. Il existe plus de cent sortes différentes de cancers, mais certaines sont beaucoup plus courantes que d'autres. Aux Etats-Unis, les cancers les plus graves sont ceux du poumon et du colon, responsables d'environ 40 % de la mortalité ; puis viennent ceux du sein, de la prostate et du pancréas, respectivement responsables d'environ 8, 7 et 5 % des décès aux Etats-Unis.

Ce qui caractérise les cancers est la prolifération anarchique de leurs cellules, qui finissent par envahir les tissus et les organes normaux du patient et entraînent sa mort. La chirurgie et la radiothérapie arrivent à éliminer les cancers localisés, mais n'atteignent pas les cellules tumorales qui ont fondé des colonies à distance ; ces dernières sont traitées par la chimiothérapie. Malheureusement, les subtances employées à présent en chiomiothérapie ne sont pas spécifiques des cellules cancéreuses ; comme la plupart agissent en endommageant l'ADN ou en contrecarrant sa synthèse, elles tuent aussi sans discernement les cellules normales qui se divisent fréquemment, telles les cellules de l'épithélium intestinal ou les cellules des lignées sanguines souches de la moelle osseuse. La toxicité de ces médicaments limite leur emploi et beaucoup de cancers résistent aux doses de substances que le patient peut tolérer. C'est pourquoi près de la moitié des patients meurent de leur cancer, malgré les grands progrès qu'on a fait dans ce domaine.

Bases moléculaire et cellulaire

L'identification de gènes viraux (comme le gène *src* de RSV) qui transforment une cellule normale en cellule cancéreuse démontra pour la première fois qu'un cancer peut être dû à l'action d'un gène particulier (un oncogène). Dès qu'on se rendit compte peu après que les oncogènes viraux sont apparentés à des gènes présents dans les cellules normales, on émit l'hypothèse que les cancers d'origine non virale (la plupart des cancers chez l'Homme) seraient dus à des mutations de gènes cellulaires normaux en oncogènes d'origine cellulaire plutôt que virale. C'est en 1981 qu'on mit ces oncogènes cellulaires en évidence dans des tumeurs humaines ; peu de temps après, on remarqua que les oncogènes humains identifiés dans les cancers de la vessie, du poumon et du colon étaient apparentés aux gènes *ras* découverts auparavant dans les virus du sarcome de rat.

Si on sait à présent que plusieurs gènes jouent un rôle critique dans l'apparition des cancers, les mutations des gènes *ras* sont une des anomalies génétiques le plus couramment décelées dans les tumeurs humaines. On trouve des oncogènes *ras* mutés dans environ 15 % des cancers humains, dont 25 % des cancers du poumon, 50 % des cancers du colon et plus de 90 % des cancers du pancréas. En outre, le rôle joué par ces oncogènes *ras* a permis de faire un lien entre l'apparition d'un cancer et une anomalie des voies de transmission des signaux qui régissent la prolifération cellulaire. Les mutations qui transforment les gènes *ras* normaux en oncogènes diminuent notablement l'hydrolyse de GTP par les protéines Ras ; aussi, les protéines oncogènes Ras mutées restent-elles figées à l'état actif, chargé de GTP, au lieu de passer alternativement de état actif à l'état inerte quand elles reçoivent un signal extracellulaire. En stimulant donc continuellement la voie de la MAP kinase, la protéine oncogène *Ras* pousse sans cesse la cellule à se diviser, même en l'absence des facteurs de croissance nécessaires à l'activation de Ras et à l'émission d'un signal de prolifération.

Prévention et traitement

La découverte d'oncogènes mutés dans les cancers humains suggéra qu'il serait possible de mettre au point des médicaments dirigés sélectivement contre les protéines oncogènes. Idéalement, ces substances devraient frapper sélectivement les cellules cancéreuses et être moins toxiques envers les cellules normales que ne le sont les médicaments courants de la chimiothérapie. Comme *ras* est souvent muté dans les tumeurs humaines, ce sont les protéines Ras qu'on a choisi comme cible des thérapies anticancéreuses.

Un trait important du mécanisme d'action de *ras* est que les protéines Ras



Colon humain cancérisé. Près de la moitié de ces cancers est due aux oncogènes *ras*. (John Cabisco / Visuals Unlimited).

induction transcriptionnelle d'une famille de 50 à 100 gènes appelés **gènes précoces à induction immédiate** ; l'induction de certains de ces gènes est sous la dépendance d'une séquence régulatrice baptisée **élément sensible au sérum (SRE)** qui est reconnue par un complexe de facteurs de transcription dont font partie le **facteur sensible au sérum (SRF)** et **Elk-1**. ERK active Elk-1 en le phosphorylant, ce qui établit l'existence d'un lien direct entre la famille ERK des kinases MAP et l'induction des gènes précoces à

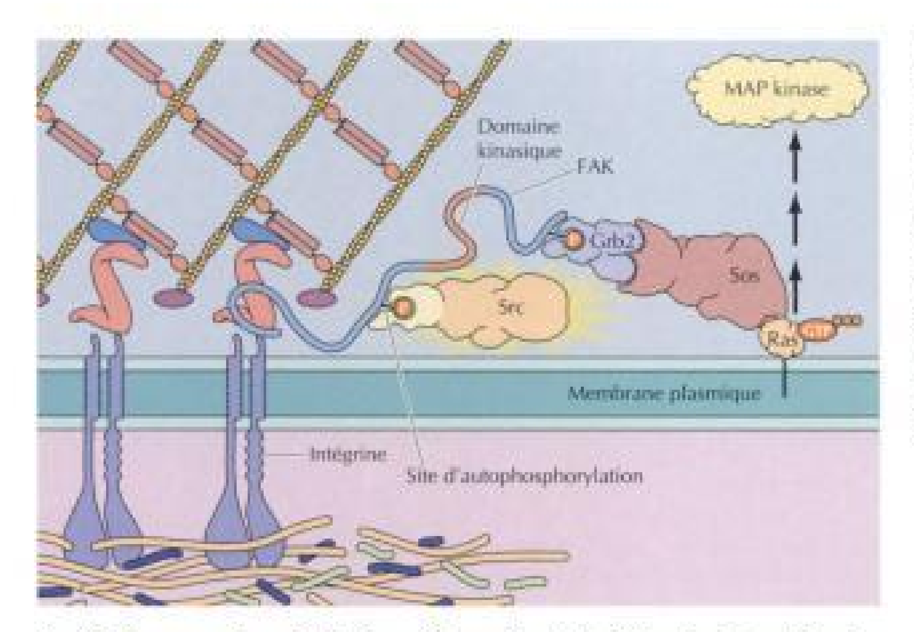


Figure 13.38
Modèle de signalisation issue de la protéine-tyrosine kinase FAK. La fixation d'intégrines à la matrice extracellulaire stimule l'activité de FAK et enclenche son autophosphorylation. Src vient ensuite s'attacher au site autophosphorylé de FAK et phosphoryle d'autres tyrosines de FAK. Ces résidus phosphotyrosine servent de sites de fixation non seulement au complexe Grb2-Sos (ce qui provoque l'activation de Ras et de la cascade kinasique MA), mais, en aval, à d'autres molécules de signalisation, dont la PI 3-kinase.

d'activité enzymatique intrinsèque. Cependant, très tôt après interaction des intégrines avec les composants de la matrice extracellulaire, on observe une phosphorylation de tyrosines protéiques, ce qui laisse supposer que les intégrines sont attachées à des protéine-tyrosine kinases non réceptrices. C'est le cas de la kinase **FAK** (pour *f*ocal *a*dhesion *k*inase), acteur principal de la voie des intégrines (figure 13.38). Comme son nom l'indique, FAK siège dans les plaques d'adhérence ; il est rapidement phosphorylé sur ses tyrosines dès que les intégrines se sont ancrées à des composants de la matrice extracellulaire, entre autres la fibronectine. Comme cela se passe pour les autres protéine-tyrosine kinases, il semble que FAK soit activé *via* une autophosphorylation induite par l'agrégation des molécules d'intégrines ancrées à la matrice extracellulaire ; on ne connaît cependant pas bien le mécanisme d'activation de FAK.

Outre FAK, des membres de la famille Src des protéine-tyrosine kinases non réceptrices s'associent également aux plaques d'adhérence et interviennent dans la voie de signalisation des intégrines. Il faut noter que Src et FAK semblent agir de concert à la suite de la fixation du domaine SH2 de Src à un site d'autophosphorylation de FAK (voir figure 13.38) ; Src phosphoryle ensuite d'autres sites de FAK, de sorte qu'on peut dire que ces deux protéine-tyrosine kinases non réceptrices transmettent solidairement les signaux reçus des récepteurs d'intégrine.

Comme on l'a décrit pour les récepteurs de facteurs de croissance, la phosphorylation de certaines tyrosines de FAK génère des sites de fixation pour les domaine SH2 d'autres messagers d'aval, notamment la PI 3-kinase et le complexe Grb2-Sos. Dès que ce dernier a recruté le facteur Sos d'échange de nucléotides guanyliques, Ras est mis en marche, ce qui accouple alors les intégrines à la voie d'activation des MAP kinases ERK. L'activation par les intégrines des protéine-tyrosine kinases non réceptrices FAK et Src asservit donc l'ancrage d'une cellule à des modifications de son comportement et de l'expression de ses gènes, modifications qui rappellent celles provoquées par la fixation de facteurs de croissance aux récepteurs plantés à la surface de la cellule.

Ajustement de la disposition du cytosquelette d'actine

La cellule répond souvent aux signaux extracellulaires, parmi lesquels les facteurs de croissance, en modifiant sa motilité et sa forme. Les changements de motilité (et de fréquence de mitose) induits par les facteurs de croissance jouent des rôles clé dans des processus tels que la guérison des blessures et le développement embryonnaire. Comme on l'a montré au chapitre 11, ces

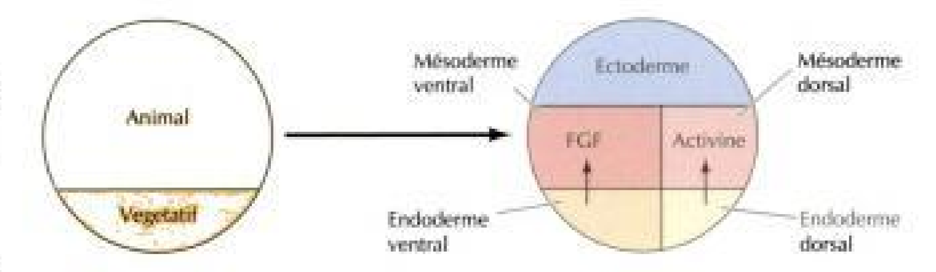


Figure 13.41
Induction de mésoderme. L'œuf de xénope comporte un pôle animal et un pôle végétatif. Les cellules du pôle animal se différencient en ectoderme, les cellules du pôle végétatif en endoderme. En outre, certaines cellules du pôle animal s'engagent à former du mésoderme quand elles rencontrent des facteurs sécrétés par les cellules du pôle végétatif. Le facteur de croissance fibroblastique (FGF) et l'activine jouent un rôle primordial dans l'induction du mésoderme respectivement ventral et dorsal.

lules du pôle végétatif ont modifié le programme de différenciation des cellules du pôle animal, qui donneront du mésoderme au lieu d'ectoderme.

Des études plus approfondies du système ont montré que l'induction du mésoderme est due à des facteurs de croissance sécrétés par les cellules du pôle végétatif (figure 13.41). Sont en jeu ici au moins deux systèmes de messagerie, qui induiront l'apparition de types de mésoderme particuliers à chaque région de l'embryon ; dans les parties ventrale et latérale, la sécrétion de facteur de croissance fibroblastique (FGF) par les cellules du pôle végétatif paraît jouer un rôle crucial dans la formation du mésoderme. FGF stimule un récepteur à activité de protéine-tyrosine kinase et on a montré qu'en bloquant cette voie de signalisation à l'aide de mutants dominants négatifs soit du récepteur, soit de Ras ou de Raf, on empêchait le mésoderme de se former ; il semble donc que le mésoderme ventral ne puisse être induit sans stimulation du récepteur de FGF (une protéine-tyrosine kinase) et mise en marche des voies de signalisation passant par les kinases Ras/Raf/MAP.

On doit l'induction du mésoderme dorsal à plusieurs facteurs sécrétés par les cellules du pôle végétatif. Un membre de la famille TGF-β appelé activine jouerait un tôle primordial dans ce processus, mais d'autres facteurs interviendraient aussi. Comme les autres membres de la famille du TGF-β, l'activine stimule un récepteur à activité de protéine-sérine/thréonine kinase, dont l'activation provoquerait (par des voies inconnues) des changements dans l'expression génique et dans la différenciation cellulaire. Bien qu'on doive explorer mieux encore ces voies de signalisation, l'induction du mésoderme chez le xénope présente un modèle de l'influence d'au moins deux familles de facteurs de croissance sur les stades précoces du développement embryonnaire.

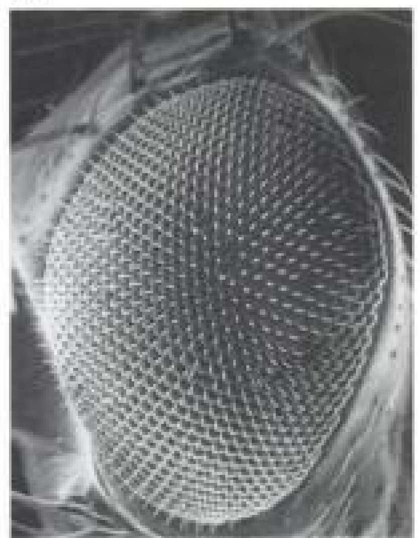
Formation de l'œil chez Drosophila

Chez la drosophile, la formation de l'œil composé fournit un bel exemple du rôle joué par les signaux différenciatoires intercellulaires sur l'organogenèse, rôle élucidé en grande partie par des études génétiques. L'œil composé de la drosophile comporte environ 800 éléments, formés chacun de huit neurones photorécepteurs (R1 à R8) et de 12 cellules lentille (figure 13.42). Les neurones photorécepteurs se développent dans un ordre fixe, commençant par R8 ; R8 induit ensuite le développement de deux de ses voisines en photorécepteurs, R2 et R5 ; R2 provoque ensuite le développement de R1 et R3, tandis que la différenciation en R4 et R6 est due à R5. Le processus se termine par la différenciation de R7, due à une interaction avec R8. Les cellules lentille proviennent des cellules qui ne se sont pas différenciées en photorécepteur.

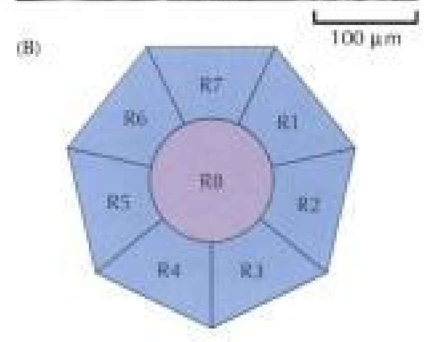
Grâce à la découverte de mutants dépourvus de R7, on a caractérisé à fond les voies de signalisation qui provoquent le développement de R7 (figure 13.43). L'un de ces mutants (*sevenless*) est déficitaire en un gène codant un récepteur à activité de protéine-tyrosine kinase exprimé par les cellules précurseurs de R7. Un autre mutant (appelé *boss*, abréviation de *bride of sevenless*) est déficitaire dans un gène codant une protéine de surface exprimée par les cellules R8. Comme Boss est le ligand de Sevenless, toute interaction directe de R8 avec une cellule précurseur activera la protéine-tyrosine kinase Sevenless. Certains travaux ont montré que la différenciation induite par le signal issu de Sevenless met aussi en jeu Ras et Raf, ce qui

Figure 13.42
Œil composé chez la drosophile. (A) Microscopie électronique à balayage de l'œil composé, formé d'environ 800 éléments séparés. (B) Chacun consiste en huit neurones photorécepteurs (étiquetés R1 à R8), qui se différencient selon un ordre et un mode immuable. (A, aimablement transmis par T. Venkatesh, University of Michi-

(A)



(B)



met en marche la voie de la MAP kinase ERK et aboutit à la phosphorylation des facteurs de transcription dont dépend la différenciation de R7.

Induction vulvaire chez Caenorhabditis elegans

Une autre analyse génétique fructueuse d'une voie de signalisation intercellulaire est celle qui a élucidé le développement de la vulve du nématode *C. elegans*. Ici, une cellule unique se différencie d'abord en cellule gonadale d'ancrage, amarrant la vulve à l'utérus ; cette cellule d'ancrage pousse alors à la différenciation de trois cellules précurseurs, qui se diviseront pour former les 22 cellules constituant la vulve.

En trouvant des mutants chez lesquels la vulve n'apparaissait pas, on a caractérisé plusieurs gènes essentiels à l'induction de la vulve, ce qui a permis de décrypter la voie qu'utilise la cellule d'ancrage pour déclencher la différenciation des cellules précurseurs de la vulve (figure 13.44). L'un de ces gènes, *lin-3*, code une protéine apparentée au facteur de croissance mammalien EGF ; la protéine Lin-3 est sécrétée par la cellule d'ancrage et va se fixer à un récepteur (Let-23) exprimé à la surface des cellules précurseurs de la vulve ; let-23 est un récepteur à activité de protéine-tyrosine kinase apparenté au récepteur d'EGF de mammifère. Parmi les gènes impliqués dans le développement de la vulve, citons encore *let-60* et *lin-45*, qui codent respectivement les protéines Ras et Raf de *C. elegans*. Le développement de la vulve de cet organisme met donc en jeu la stimulation d'un récepteur à activité de protéine-tyrosine kinase par un facteur de croissance et la mise en marche consécutive de la voie de signalisation Ras/Raf, semblable à l'induction du mésoderme ventral chez le xénope et à celle du photorécepteur R7 chez la drosophile.

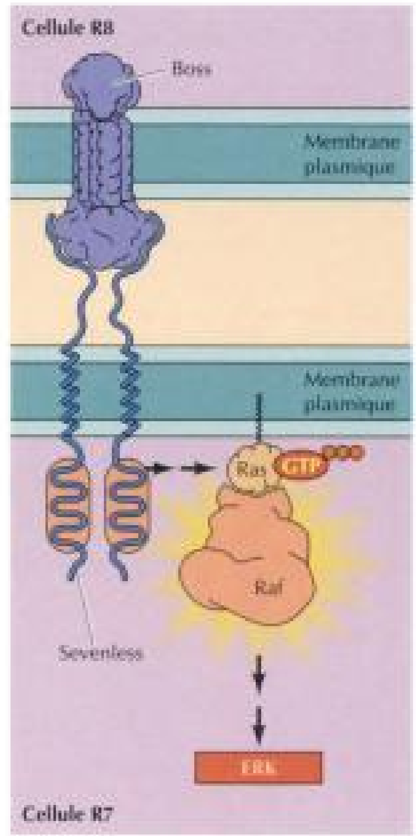


Figure 13.43
Induction de la différenciation de R7. La différenciation du neurone photorécepteur R7 est due au contact entre une cellule précurseur et R8. La protéine Boss de la surface de R8 est le ligand du récepteur Sevenless à activité de protéine-tyrosine kinase, exprimé par la cellule précurseur de R7. La stimulation de Sevenless active la voie Ras/Raf/Map kinase ERK.

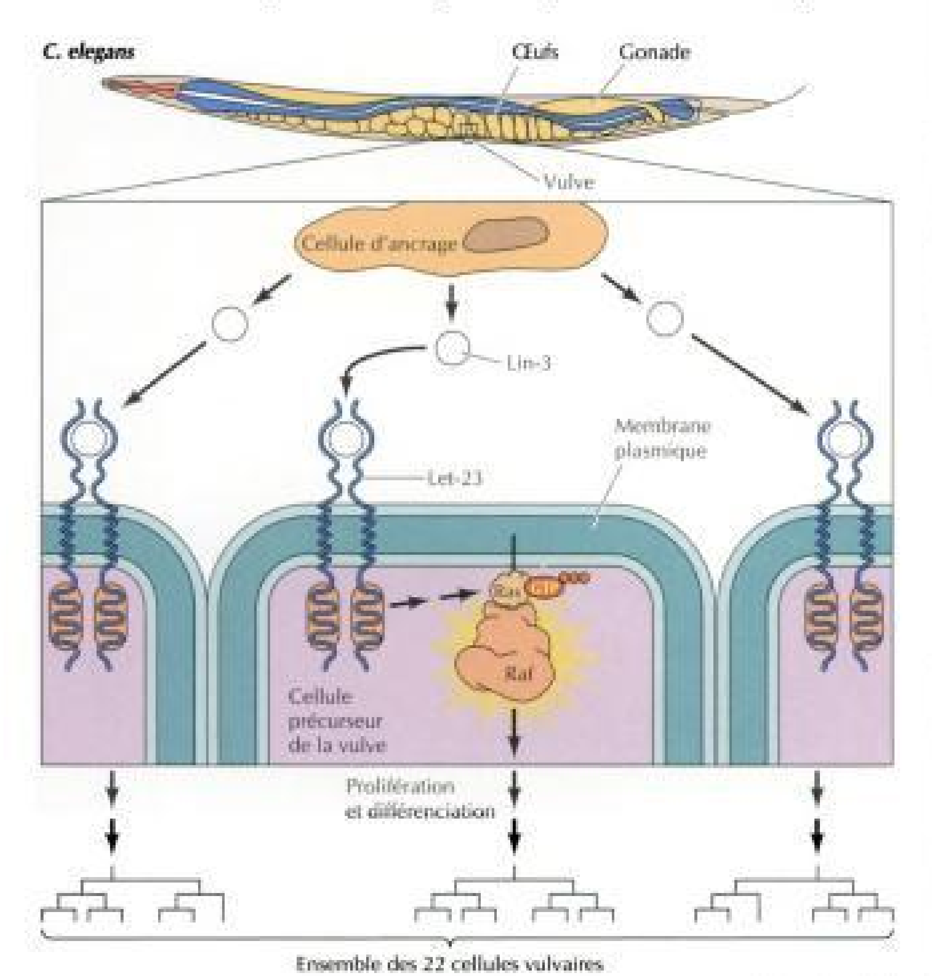


Figure 13.44
Induction de la vulve chez *Caenorhabditis elegans*. La cellule gonadale d'ancrage sécrète Lin-3, un parent de EGF. Lin-3 stimule Let-23, un récepteur à activité de protéine-tyrosine kinase exprimé par les cellules précurseurs de la vulve. Une fois activé, Let stimule la voie Ras/Raf, ce qui pousse trois cellules vulvaires précurseurs à proliférer et à se différencier pour former les 22 cellules composant la vulve.

TERMES CLÉ

messager endocrine, hormone, messager paracrine, messager autocrine

hormone stéroïde, testostérone, œstrogène, progestérone, corticostéroïde, glucocorticoïde, minéralocorticoïde, ecdysone, hormone thyroïdienne, vitamine D3, acide rétinoïque, rétinoïde, superfamille des récepteurs de stéroïde

monoxyde d'azote

neuromédiateur

hormone peptidique, neuropeptide, enképhaline, endorphine, neurohormone, facteur de croissance, facteur de croissance neuronal (NGF), neurotrophine, facteur de croissance épithélial (EGF), facteur de croissance plaquettaire (PDGF), cytokine, facteur de croissance ancré aux membranes

icosanoïde, prostaglandine, prostacycline, thromboxane, leucotriène

hormone végétale, auxine, gibbérelline, cytokinine, acide abscisique, éthylène

protéine G, récepteur couplé à une protéine G, protéine G hétérotrimérique

récepteur à activité de protéine-tyrosine kinase, autophosphorylation, domaine SH2

superfamille des récepteurs de cytokine, protéine-tyrosine kinase non réceptrice, Src, kinase Janus (JAK)

protéine-tyrosine phosphatase, facteur transformant β (TGF-β), protéine-sérine/thréonine kinase, guanylyl cyclase

Résumé

MOLÉCULES SIGNAL ET LEURS RÉCEPTEURS

Modalité de la signalisation intercellulaire : La plupart des molécules signal sont sécrétées par une cellule et s'attachent à un récepteur exprimé par une cellule cible. Selon la distance que parcourt le signal, on distingue trois catégories de modes de transmission : endocrine, paracrine et autocrine.

Hormones stéroïdes et superfamille des récepteurs de stéroïdes : Les hormones stéroïdes comme l'hormone thyroïdienne, la vitamine D_3 et l'acide rétinoïque sont de petites molécules hydrophobes qui diffusent à travers la membrane plasmique de leurs cellules cible et s'attachent à des récepteurs intracellulaires. Les membres de la superfamille des récepteurs de stéroïdes fonctionnent comme des facteurs de transcription pour ajuster de façon directe l'expression des gènes commandée par un ligand déterminé.

Monoxyde d'azote : le monoxyde d'azote est un important messager paracrine dans plusieurs types de cellules.

Neuromédiateurs : Un neuromédiateur est une petite molécule hydrophile qui, à travers une synapse, transmet le signal d'un neurone à un autre ou d'un neurone à une autre cellule cible. Maints neuromédiateurs s'attachent à des tunnels à ions ouverts par un ligand.

Hormones peptidiques et facteurs de croissance : Chez l'animal, l'éventail le plus large de molécules signal est constitué de peptides, longs de quelques résidus à plus d'une centaine de résidus d'acide aminé. Ce groupe comprend les hormones peptidiques, les neuropeptides et les facteurs de croissance.

Icosanoïdes : Les icosanoïdes sont une classe de lipides utilisés comme messagers paracrine et autocrine.

Hormones végétales : Les hormones végétales sont de petites molécules qui commandent la croissance et la différenciation des cellules végétales.

RÔLE DES RÉCEPTEURS CELLULAIRES SUPERFICIELS

Récepteurs couplés à une protéine G : La plus grande famille de récepteurs superficiels, dont les récepteurs de nombreuses hormones et neuromédiateurs, transmettent le signal à des cibles intracellulaires par le truchement de protéines G.

Récepteurs à activité de protéine-tyrosine kinase : Les récepteurs de facteurs de croissance sont le plus souvent des protéine-tyrosine kinases.

Récepteurs de cytokines et protéine-tyrosine kinases non réceptrices :Les récepteurs de cytokines agissent, pour la plupart, en association avec une protéine-tyrosine kinase dépourvue d'activité réceptrice.

Récepteurs possédant d'autres activités enzymatiques : Parmi les autres récepteurs plantés à la surface d'une cellule, on trouve des protéine-phosphotyrosine phosphatases, des protéine-sérine/thréonine kinases et des guanylyl cyclases.

VOIES INTRACELLULAIRES DE TRANSDUCTION D'UN SIGNAL

Voie de l'AMPc : messagers seconds et phosphorylation de protéines : L'AMPc est l'important messager second qui permet à la cellule animale de répondre à certaines hormones et odeurs. Dans la plupart des cas, l'AMPc agit par le truchement de la protéine kinase A, qui phosphoryle des enzymes du métabolisme et le facteur de transcription CREB.

transduction intracellulaire de signal, AMP cyclique (AMPc), messager second, adénylyl cyclase, AMPc phosphodiestérase, protéine kinase AMPc-dépendante, protéine kinase A, élément sensible à l'APMc, CREB

GMP cyclique : Cet autre messager second est souvent en jeu dans la cellule animale ; son rôle le mieux connu s'exerce dans la cellule photoréceptrice de la rétine des vertébrés.

GMP cyclique (GMPc), rhodopsine, transducine, GMPc phosphodiestérase

Phospholipides et Ca^{2+} : Les phospholipides et l'ion Ca^{2+} sont des messagers seconds actifs en aval des récepteurs couplés à des protéines G et à des protéine-tyrosine kinases. L'hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5-*bis*phosphate (PIP_2) produit du diacylglycérol, qui active la protéine kinase C, et de l'inositol 1,4,5-*tris*phosphate, qui libère le Ca^{2+} des réserves intracellulaires. L'accroissement du taux de Ca^{2+} cytosolique active alors divers protéines cible, dont les protéine kinases asservies au couple Ca^{2+}/calmoduline. Dans les cellules générant un potentiel d'action, comme les myocytes et les neurones, le taux de Ca^{2+} cytosolique s'élève par ouverture des tunnels voltaïques à Ca^{2+} logés dans la membrane plasmique et par celle des récepteurs ryanodine implantés dans les réticulums endoplasmique et sarcoplasmique. S'il peut donner du diacylglycérol et du IP_3 par hydrolyse, PIP_2 serait phosphorylé pour donner un autre messager second, PIP_3.

phosphatidylinositol 4,5-*bis*phosphate (PIP2), phospholipase C, diacylglycérol, inositol 1,4,5-*tris*phosphate (IP3), protéine kinase C, ester de phorbol, NF-κB, IκB, calmoduline, CaM kinase II, récepteur type ryanodine, phosphatidylinositide (PI) 3-kinase, phosphatidylinositol 3,4,5-*tris*phosphate (PIP3

Voies mettant en jeu Ras, Raf et la kinase MAP : La voie de la kinase MAP est constituée d'une série de protéine kinases bien conservées, actives en réponse à plusieurs signaux extracellulaires. Dans la cellule animale, les kinases MAP le mieux connues sont couplées à des récepteurs de facteur de croissance par la petite protéine Ras qui, chargée de GTP, amorce la cascade des protéine kinases menant à l'activation de ERK, une kinase MAP. ERK phosphoryle alors diverses protéines cytoplasmiques et nucléaires, parmi lesquelles le facteur de transcription régissant les gènes précoces à induction immédiate.

MAP kinase, ERK, Ras, Raf, MEK, facteur d'échange de nucléotides guanyliques, protéine activant une GTPase, petite protéine fixant GTP, gène précoce immédiat, élément sensible au sérum (SRE), facteur sensible au sérum (SRF), Elk-1

Voie JAK/STAT : Les protéines STAT sont des facteurs de transcription pourvus de domaines SH2 ; elles sont directement mises en branle par des protéine-tyrosine kinases associées aux récepteurs de cytokine et aux récepteurs de facteurs de croissance.

voie JAK/STAT, protéine STAT

TRANSDUCTION DE SIGNAL ET CYTOSQUELETTE

Intégrines et transduction de signal : L'attachement d'une intégrine à la matrice extracellulaire stimule la protéine-tyrosine kinase non réceptrice FAK, ce qui provoque l'activation de la kinase MAP ainsi que d'autres voies de signalisation situées en aval.

FAK

Régulation de la structure du cytosquelette d'actine : En remodelant le cytosquelette d'actine, les facteurs de croissance provoquent des modifications du mouvement et de la forme des cellules. Ces altérations du cytosquelette sont dues à l'entrée en jeu de membres de la sous-famille Rho des petites protéines fixant GTP.

Rho, Rac, Cdc42

Massagué, J. and A. Pandiella. 1993. Membrane-anchored growth factors. *Ann. Rev. Biochem.* 62: 515–541. [R]

Means, A. L. and L. J. Gudas. 1995. The roles of retinoids in vertebrate development. *Ann. Rev. Biochem.* 64: 201–233. [R]

Ross, R., E. W. Raines and D. F. Bowen-Pope. 1986. The biology of platelet-derived growth factor. *Cell* 46: 155–169. [R]

Schmidt, H. H. H. W. and U. Walter. 1994. NO at work. *Cell* 78: 919–925. [R]

Sennequier, N. *et al.* 1998. Biosynthèse du monoxyde d'azote (NO) : mécanisme, régulation et contrôle. *Médecine/Sciences* **14** :1185-1194.[R]

Tsai, M.-J. and B. W. O'Malley. 1994. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Ann. Rev. Biochem.* 63: 451–486. [R]

Vane, J. and R. Botting. 1987. Inflammation and the mechanism of action of anti-inflammatory drugs. *FASEB J.* 1: 89–96. [R]

Rôle des récepteurs à la surface cellulaire

Artavanis-Tsakonas, S., K. Matsuno and M. E. Fortini. 1995. Notch signaling. *Science* 268: 225–232. [R]

Bloch-Gallego, E. et Sotelo, C. 1998. Chimio-attraction et chimio-répulsion axonale : rôle des nétrines et des sémaphorines. *Médecine/Sciences* **14** :44-52.[R]

Derynck, R. 1994. TGF-β receptor-mediated signaling. *Trends Biochem. Sci.* 19: 548–553. [R]

Garbers, D. L. and D. G. Lowe. 1994. Guanylyl cyclase receptors. *J. Biol. Chem.* 269: 30741–30744. [R]

Heldin, C.-H. 1995. Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell* 80: 213–223. [R]

Hepler, J. R. and A. G. Gilman. 1992. G proteins. *Trends Biochem. Sci.* 17: 383–387. [R]

Hunter, T. and B. M. Sefton. 1980. Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 1311–1315. [P]

Ihle, J. N. 1995. Cytokine receptor signalling. *Nature* 377: 591–594. [R]

Lemmon, M. A. and J. Schlessinger. 1994. Regulation of signal transduction and signal diversity by receptor oligomerization. *Trends Biochem. Sci.* 19: 459–463. [R]

Massagué, J., L. Attisano and J. L. Wrana. 1994. The TGF-β family and its composite receptors. *Trends Cell Biol.* 4: 172–178. [R]

Nazih, F. et Delbart, Ch. 1998. Transmission de signal intracellulaire par les protéines ancrées par un glycosylphosphatidylinositol. *Médecine/Sciences* **14** :275-282.[R]

Neer, E. J. 1995. Heterotrimeric G proteins: Organizers of transmembrane signals. *Cell* 80: 249–257. [R]

Pawson, T. 1995. Protein modules and signalling networks. *Nature* 373: 573–580. [R]

Rodbell, M. 1980. The role of hormone receptors and GTP-regulatory proteins in membrane transduction. *Nature* 284: 17–22. [R]

Strader, C. D., T. M. Fong, M. R. Tota, D. Underwood and R. A. F. Dixon. 1994. Structure and function of G protein-coupled receptors. *Ann. Rev. Biochem.* 63: 101–132. [R]

Taniguchi, T. 1995. Cytokine signaling through nonreceptor protein tyrosine kinases. *Science* 268: 251–255. [R]

Van der Geer, P., T. Hunter and R. A. Lindberg. 1994. Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Ann. Rev. Cell Biol.* 10: 251–337. [R]

Weiss, A. and D. R. Littman. 1994. Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* 76: 263–274. [R]

Voies des messageries intracellulaires

Blenis, J. 1993. Signal transduction via the MAP kinases: Proceed at your own RSK. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5889–5892. [R]

Bockaert, J. et Pin, J.-Ph. 1998. Utiliser un récepteur couplé aux protéines G pour communiquer : un succès évolutif. *C. R. Acad. Sci. Paris* **321** :529-551.

Boriack-Sjodin, P. *et al.* 1998. The structural basis of the activation of Ras by Sos. *Nature* **394** :337-343.[O]

Clapham, D. E. 1995. Calcium signaling. *Cell* 80: 259–268. [R]

Cobb, M. H. and E. J. Goldsmith. 1995. How MAP kinases are regulated. *J. Biol. Chem.* 270: 14843–14846. [R]

Cooper, D. M. F., N. Mons and J. W. Karpen. 1995. Adenylyl cyclases and the interaction between calcium and cAMP signaling. *Nature* 374: 421–424. [R]

Daum, G., I. Eisenmann-Tappe, H.-W. Fries, J. Troppmair and U. R. Rapp. 1994. The ins and outs of Raf kinases. *Trends Biochem. Sci.* 19: 474–480. [R]

de Rooij, J. *et al.* 1998. Epac is a Rap-1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* **396** :474-477.[O]

Divecha, N. and R. F. Irvine. 1995. Phospholipid signaling. *Cell* 80: 269–278. [R]

Exton, J. H. 1994. Phosphatidylcholine breakdown and signal transduction. *Biochim. Biophys. Acta* 1212: 26–42. [R]

Frank, D. A., and M. E. Greenberg. 1994. CREB: A mediator of long-term memory from mollusks to mammals. *Cell* 79: 5–8. [R]

Ghosh, A. and M. E. Greenberg. 1995. Calcium signaling in neurons: Molecular mechanisms and cellular consequences. *Science* 268: 239–247. [R]

Hannun, Y. A. 1994. The sphingomyelin cycle and the second messenger function of ceramide. *J. Biol. Chem.* 269: 3125–3128. [R]

Hanson, P. I. and H. Schulman. 1992. Neuronal Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinases. *Ann. Rev. Biochem.* 61: 559–601. [R]

Herskowitz, I. 1995. MAP kinase pathways in yeast: For mating and more. *Cell* 80: 187–197. [R]

Hill, C. S. and R. Treisman. 1995. Transcriptional regulation by extracellular signals: Mechanisms and specificity. *Cell* 80: 199–211. [R]

Hunter, T. 1995. Protein kinases and phosphatases: The yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* 80: 225–236. [R]

Hunter, T. and M. Karin. 1992. The regulation of transcription by phosphorylation. *Cell* 70: 375–387. [R]

Ihle, J. N. 1996. Cytokine receptor signalling. *Nature* 377: 591–594. [R]

Iiri, T. *et al.* 1998. G-protein diseases furnish a model for the turn-on switch. *Nature* **394** :35-38.[R]

Lincoln, T. M. and T. L. Cornwell. 1993. Intracellular cyclic GMP receptor proteins. *FASEB J.* 7: 328–338. [R]

Lowy, D. R. and B. M. Willumsen. 1993. Function and regulation of Ras. *Ann. Rev. Biochem.* 62: 851–891. [R]

Marshall, C. J. 1995. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: Transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 80: 179–185. [R]

Nishizuka, Y. 1992. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 258: 607–614. [R]

Schindler, C. and J. E. Darnell Jr. 1995. Transcriptional responses to polypeptide ligands: The JAK-STAT pathway. *Ann. Rev. Biochem.* 64: 621–651. [R]

Schlessinger, J. 1993. How receptor tyrosine kinases activate Ras. *Trends Biochem. Sci.* 18: 273–275. [R]

Shenolikar, S. 1994. Protein serine/threonine phosphatases: New avenues for cell regulation. *Ann. Rev. Cell Biol.* 10: 55–86. [R]

Stryer, L. 1991. Visual excitation and recovery. *J. Biol. Chem.* 266: 10711–10714. [R]

Taussig, R. and A. G. Gilman. 1995. Mammalian membrane-bound adenylyl cy-clases. J. Biol. Chem. 270: 1–4. [R]

Taylor, S. S., D. R. Knighton, J. Zheng, L. F. Ten Eyck and J. M. Sowadski, 1992. Structural framework for the protein kinase family. *Ann. Rev. Cell Biol.* 8: 429–462. [R]

Thanos, D. and T. Maniatis. 1995. NF-κB: A lesson in family values. *Cell* 80: 529–532. [R]

Vignais, M.-L. 1997. Protéines JAK et STAT dans la transmision du signal cellulaire. *Médecine/Sciences* **13** :1277.

Vojtek, A. B. and J. A. Cooper. 1995. Rho family members: Activators of MAP kinase cascades. *Cell* 82: 527–529. [R]

Yarfitz, S. and J. B. Hurley. 1994. Transduction mechanisms of vertebrate and invertebrate photoreceptors. *J. Biol. Chem.* 269: 14329–14332. [R]

Yin, M.-J. *et al.* 1998. The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of IκB kinase-β. *Nature* **396** :77-80. [O] + commentaire p.15.

Zufall, F., S. Firestein and G. M. Shepherd. 1994. Cyclic nucleotide-gated ion channels and sensory transduction in olfactory receptor neurons. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 23: 577–607. [R]

Transduction de signal et cytosquelette

Chong, L. D., A. Traynor-Kaplan, G. M. Bokoch, and M. A. Schwartz. 1994. The small GTP-binding protein Rho regulates a phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase in mammalian cells. *Cell* 79: 507–513. [P]

Clark, E. A. and J. S. Brugge. 1995. Integrins and signal transduction pathways: The road taken. *Science* 268: 233–239. [R]

Hall, A. 1994. Small GTP-binding proteins and the regulation of the actin cytoskeleton. *Ann. Rev. Cell Biol.* 10: 31–54. [R]

Nobles, C. D. and A. Hall. 1995. Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81: 53–62. [P]

Schaller, M. D. and J. T. Parsons. 1993. Focal adhesion kinase: An integrin-linked protein tyrosine kinase. *Trends Cell Biol.* 3: 258–262. [R]

Messsages dans l'organogenèse et la différenciation

Amaya, E., T. J. Musci and M. Kirschner. 1991. Expression of a dominant negative mutant of the FGF receptor disrupts mesoderm formation in *Xenopus* embryos. *Cell* 66: 257–270. [P]

Dickson, B. 1995. Nuclear factors in sevenless signalling. *Trends Genet.* 11: 106–111. [R]

Gilbert, S. F. 1994. *Developmental Biology.* 4th ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates.

Kessler, D. S. and D. A. Melton. 1994. Vertebrate embryonic induction: Mesodermal and neural patterning. *Science* 266: 596–604. [R]

Le Douarin, N. Les chimères de caille et de poulet pour étudier l'embryogenèse. *Pour la Science* n° 252 :46-554.

Meyerowitz, E. M. 1998. Voici des gènes, des tiges, des feuilles et des fleurs (morphogenèse végétale). *La Recherche* n°305 :46-49.[R]

Nüsslein-Volhard, Ch. 1996. Le développement de l'embryon. *Pour la Science* n° 228 :82-88. [R]

Shi *et al.* 1996. Les gènes de la métamorphose. *La Recherche* n°286 :58.

Slack, J. M. W. 1991. *From Egg to Embryo: Regional Specification in Early Development.* 2d ed. Cambridge, England: Cambridge University Press.

Smith, J. C. 1993. Mesoderm-inducing factors in early vertebrate development. *EMBO J.* 12: 4463–4470. [R]

Sternberg, P. W. 1993. Intercellular signaling and signal transduction in *C. elegans*. *Ann. Rev. Genet.* 27: 497–521. [R]

Zipursky, S. L. and G. M. Rubin. 1994. Determination of neuronal cell fate: Lessons from the R7 neuron of *Drosophila*. *Ann. Rev. Neurosci.* 17: 373–397. [R]

14 Le cycle cellulaire

L'autoreproduction est la singularité la plus essentielle de la cellule — c'est aussi celle de tous les êtres vivants. Toute cellule se reproduit par scission en deux descendants, chaque cellule mère générant deux cellules filles à la fin de chaque cycle de division. Ces cellules filles grossiront, puis se diviseront elles-mêmes pour fonder une nouvelle population cellulaire issue de la croissance et de la division d'une seule cellule parentale, puis de ses descendants. Dans le cas le plus simple, ces cycles de croissance et de division font qu'une cellule bactérienne génère à elle seule, en une nuit dans une boîte d'agar nutritif, une colonie formée de plusieurs millions de cellules filles. Dans le cas le plus complexe, les cycles successifs de croissance et de division d'un œuf fécondé produiront les quelques 10^{13} cellules qui composent le corps humain.

Pour qu'une cellule lègue à ses cellules filles un génome intact, ses divisions doivent être soigneusement orchestrées et coordonnées tant avec la croissance cellulaire qu'avec la réplication de l'ADN. Dans les cellules d'eucaryote, le parcours du cycle cellulaire est sous la commande d'une série de protéine kinases bien conservées dans les phylum allant des levures aux mammifères. Chez les eucaryotes supérieurs, la machinerie aux commandes du cycle cellulaire est elle-même asservie aux facteurs de croissance qui gouvernent la prolifération cellulaire ; ceci permet que la division de la première cellule venue réponde aux besoins de l'organisme en tant qu'entité distincte. On doit s'attendre à ce que les dérèglements du cycle cellulaire entraînent la prolifération anormale des cellules qui caractérisent une tumeur ; aussi voyons-nous l'étude du cycle cellulaire et celle du cancer s'interpénétrer de plus en plus, comme on avait vu, au chapitre 13, les travaux des cancérologues rejoindre les études sur les voies de signalisation cellulaires.

LE CYCLE DE LA CELLULE EUCARYOTE

Le cycle de division de la plupart des cellules comporte quatre processus coordonnés, à savoir une croissance, une réplication d'ADN, une répartition des chromosomes répliqués aux pôles du fuseau puis un partage de la cellule. Chez la bactérie, la croissance et la réplication d'ADN ont lieu pendant la plus grande partie du cycle cellulaire et c'est ancrés à la membrane plas-

mique que les chromosomes dupliqués gagnent les cellules filles. Chez les eucaryotes, le cycle est plus élaboré et comprend quatre étapes distinctes ; si la période de croissance y est d'ordinaire prolongée, l'ADN n'est synthétisé que pendant une étape du cycle puis les chromosomes répliqués se répartissent au noyau des cellules filles par une suite d'événements qui aboutissent à la partition de la cellule. Le passage d'un stade du cycle au suivant dépend d'un appareil régulateur bien conservé, qui non seulement coordonne les étapes du cycle, mais aussi asservit le cycle à des signaux extracellulaires qui ajustent la prolifération cellulaire.

Phases du cycle cellulaire

Le cycle classique d'une cellule eucaryote s'observe facilement sur des cellules humaines en culture, qui se divisent environ toutes les 24 heures. Au microscope, les deux stades patents d'un cycle sont la **mitose** et l'**interphase**. La mitose (ou division nucléaire), l'étape la plus frappante du cycle, correspond à la séparation des chromosomes fils et s'achève d'habitude par la division de la cellule (**cytocinèse**). Cependant, comme mitose et cytocinèse ne prennent qu'une heure environ, 95 % de la durée d'un cycle correspond à l'interphase — la période qui sépare deux mitoses. Durant l'interphase, les chromosomes sont décondensés et distribués dans tout le noyau, de sorte que la structure du noyau paraît uniforme, mais au niveau moléculaire, l'interphase est la période pendant laquelle croissance cellulaire et réplication d'ADN s'effectuent de manière coordonnée en vue de la division cellulaire.

La cellule grossit progressivement pendant toute l'interphase, la plupart des cellules doublant de taille entre leur naissance et leur partage en deux. Par contre, l'ADN n'est synthétisé que pendant une partie de l'interphase ; c'est l'échéance de cette synthèse qui marque les quatre étapes bien distinctes du cycle cellulaire (figure 14.1). La **phase M** du cycle correspond à la mitose, habituellement suivie de la cytocinèse. Cette phase M est suivie de la **phase G_1** (pour *gap 1*), qui correspond à l'intervalle séparant une mitose du

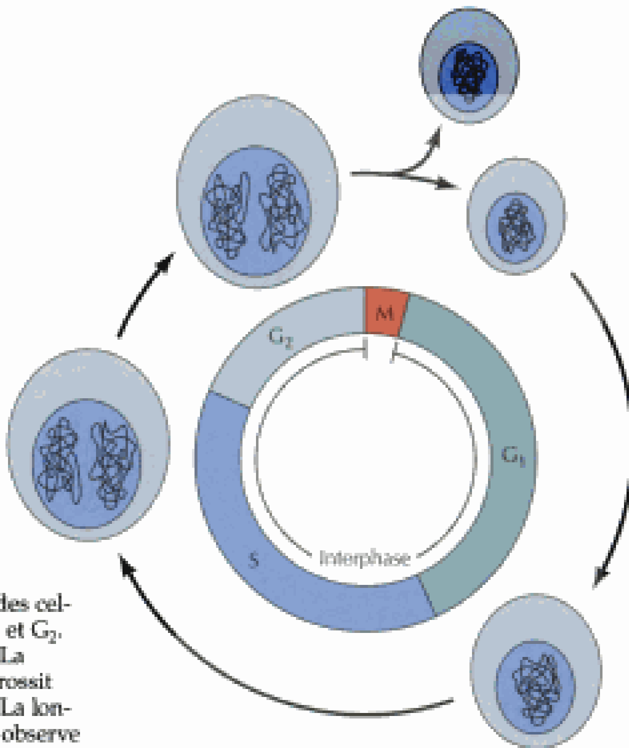


Figure 14.1
Phases du cycle cellulaire. Le cycle de division de la plupart des cellules eucaryotiques comporte quatre phases distinctes : M, G_1, S et G_2. La phase M (mitose) est habituellement suivie de la cytocinèse. La phase S est celle durant laquelle l'ADN se réplique. La cellule grossit pendant toute l'interphase, qui comprend les phase G_1, S et G_2. La longueur relative des phase du cycle représentée ici est celle qu'on observe dans des cellules de mammifères qui se reproduisent rapidement.

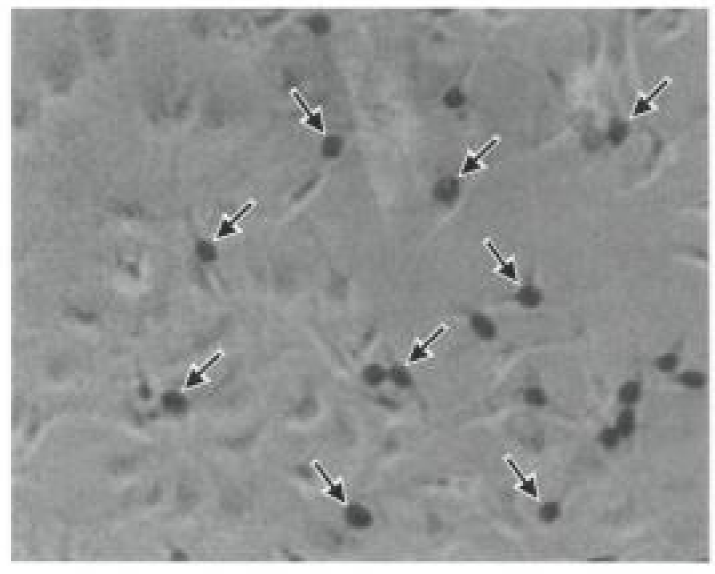
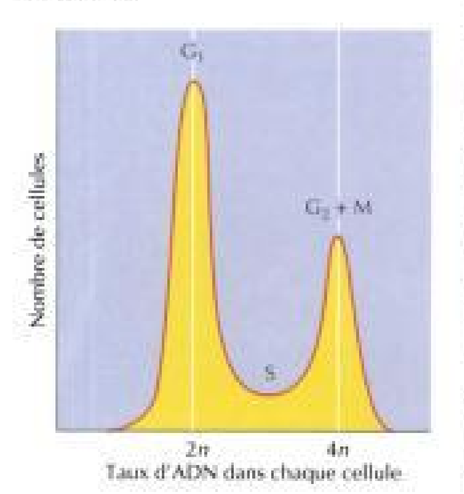


Figure 14.3
Identification de phases S à l'aide de désoxythymidine radioactive. On a incubé les cellules en présence de désoxythymidine radioactive puis on les a observées après autoradiographie ; les flèches indiquent les cellules marquées. (D'après D. W. Stacey *et al.* 1991, *Mol. Cell Biol.* **11** :4053)

qu'elle étaient en phase S pendant l'incubation en présence de désoxythymidine radioactive, seront reconnaissables pendant plusieurs heures, le temps qu'elles parcourent leurs phases S et G_2. Par contre, on n'observera de cellules radioactives en mitose que quatre heures après le marquage ; ce délai correspond à la durée de G_2 — laps de temps minimal pour qu'une cellule qui a incorporé de la désoxythymidine radioactive à la fin de la phase S entre en mitose.

On reconnaît encore les cellules à chacune des phases du cycle cellulaire par leur contenu en ADN (figure 14.4). Ainsi, les cellules animales en G_1 sont diploïdes (elles possèdent deux lots de chacun des chromosomes) ; on dit que leur teneur en ADN est de $2n$, n désignant le contenu haploïde en ADN du génome. Durant la phase S, la réplication fait passer de $2n$ à $4n$ la teneur en ADN de la cellule ; aussi les cellules en phase S possèdent une quantité d'ADN située entre $2n$ et $4n$. Leur teneur en ADN reste égale à $4n$ durant les phases G_2 et M, pour tomber à $2n$ après la cytocinèse. On mesure facilement le contenu en ADN d'une cellule en l'incubant en présence d'une substance fluorescente qui se fixe à l'ADN, puis en mesurant l'intensité de fluorescence de chacune des cellules dans un **cytomètre de flux** ou un **trieur de cellules marquées par fluorescence**, qui reconnaît les phases G_1, S et G_2/M du cycle cellulaire.

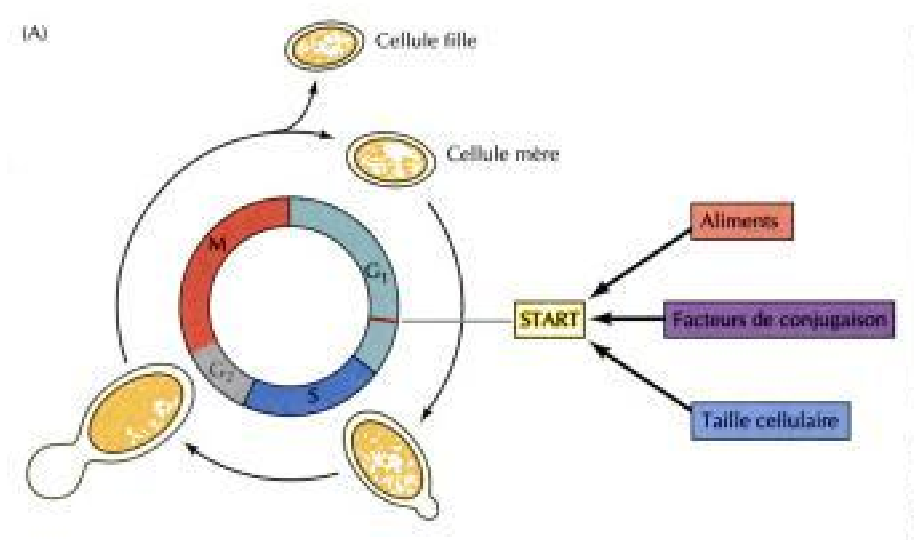
Figure 14.4
Dosage de la teneur en ADN d'une population cellulaire. On marque les cellules étudiées par un colorant fluorescent qui se fixe à l'ADN. On introduit ensuite les cellules de cette culture dans un cytomètre de flux, qui enregistre l'intensité de la fluorescence de chacune des cellules. On porte le nombre de cellules en fonction de l'intensité de fluorescence, proportionnelle à leur teneur en ADN. On observe deux pics, l'un correspondant à des cellules dont le contenu en ADN est de $2n$, l'autre à des cellules $4n$; ces cellules sont respectivement au stade G_1 et G_2/M du cycle cellulaire. Les cellules en phase S possèdent une teneur en ADN comprise entre $2n$ et $4n$ et correspondent à l'espace situé entre les deux pics.



Régulation du cycle cellulaire par la taille de la cellule et par des signaux extracellulaires

Le parcours du cycle de division par une cellule est gouverné non seulement par des signaux extracellulaires, mais aussi par des signaux internes qui jaugent et coordonnent les divers processus accomplis lors des phases du cycle cellulaire. Parmi les exemples de régulation du cycle par des signaux extracellulaires, citons l'influence des facteurs de croissance sur la prolifération des cellules animales. De plus, maints événements cellulaires, comme la croissance, la réplication d'ADN et la mitose, exigent une coordination tout au long du décours du cycle ; cette coordination dépend d'une série de points de contrôle qui régissent le passage à telle ou telle phase du cycle cellulaire.

Un point de décision important du cycle de beaucoup de types cellulaires se situe à la fin de G_1, et régit la passage de G_1 à S. En étudiant la levure bourgeonnante *S. cerevisiae*, on a découvert ce point de décision, qu'on a baptisé **START** (figure 14.5). Dès qu'une cellule a franchi START, elle s'engage à parcourir la phase S et à subir un tour de division. Le franchissement de



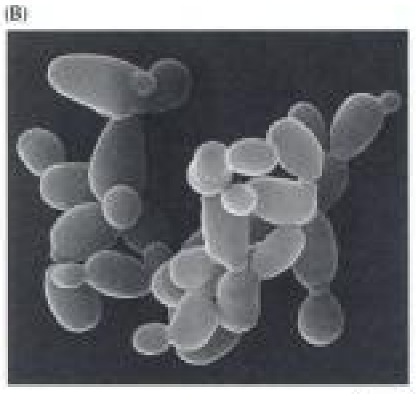


Figure 14.5
Régulation du cycle cellulaire dans une levure bourgeonnante. (A) Le cycle cellulaire de *Saccharomyces cerevisiae* est réglé surtout en un point de la fin de G_1 appelé START. Le dépassement de START dépend d'une fourniture adéquate d'aliments, de facteurs de conjugaison et d'une taille minimale atteinte par la cellule. Remarquez que ces cellules se divisent par bourgeonnement. Le bourgeon apparaît peu après le point START et grossit jusqu'à ce qu'il se détache de la cellule mère à la fin de la mitose. Comme la cellule fille issue du bourgeon est plus petite que la cellule mère, sa croissance exige une phase G_1 plus longue avant d'aborder le cycle cellulaire suivant. Si les phases G_1 et S ont ici leur durée habituelle, le fuseau mitotique apparaît durant la phase S, de sorte que le cycle cellulaire des levures bourgeonnantes est dépourvu de phase G_2 bien nette. (B) Micrographie électronique à balayage de cellules de *S. cerevisiae*. D'après la taille du bourgeon, on peut juger de la phase du cycle dans laquelle se trouve la cellule. (Cliché dû à l'obligeance de D. M. Philips/Visuals Unlimited).

START est cependant un événement très bien ajusté chez la levure, où il dépend de signaux externes, notamment des aliments disponibles, ainsi que de la taille atteinte par la cellule. Si, par exemple, la cellule est soumise à un régime carentiel, elle arrête son cycle au point START et se met au repos au lieu de passer à la phase S. START représente donc un point de décision où la cellule jauge si elle dispose d'assez d'aliments pour survivre tout au long du reste du cycle de division. Les polypeptides qui déclenchent la conjugaison des levures arrêtent aussi la cellule en START, laissant le temps aux cellules de levure haploïdes de fusionner avec une congénère au lieu de passer en phase S.

Outre qu'il sert de centre décisionnel pour trier les signaux extracellulaires, START est l'endroit où la croissance cellulaire est coordonnée avec la réplication d'ADN et la division de la cellule. L'importance de cette régulation est particulièrement flagrante chez les levures bourgeonnantes, chez lesquelles la division génère deux cellules filles de taille très différente, à savoir une grosse cellule mère et une petite cellule fille. Les cellules ne conserveraient pas une taille constante si la cellule fille ne croissait pas plus que la cellule mère avant leur prochaine division ; il doit donc exister un système qui jauge la taille atteinte par la cellule, de façon à coordonner la croissance cellulaire avec d'autres événements du cycle cellulaire. Cet ajustement a lieu grâce à un mécanisme de contrôle qui empêche la cellule de franchir START avant d'avoir atteint une taille suffisante ; aussi la phase G_1 de la petite cellule fille est-elle plus longue que celle de la cellule mère, ce qui lui donne le temps de grossir plus.

La prolifération de la plupart des cellules animales est également soumise à une décision prise à la phase G_1 du cycle ; un point de décision particulier à la fin de G_1, le **point de restriction** de la cellule animale, correspond au START des levures (figure 14.6), mais contrairement aux levures, le parcours du cycle par la cellule animale ne dépend guère de la richesse en nutriments, mais surtout de facteurs de croissance présents dans le milieu, qui poussent la cellule à se diviser. En présence des facteurs de croissance appropriés, la cellule franchit le point de restriction et entame sa phase S ; une fois franchi

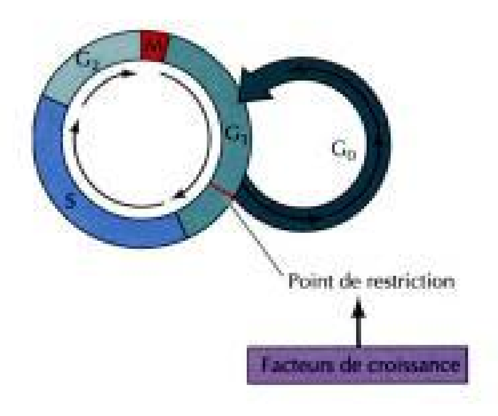
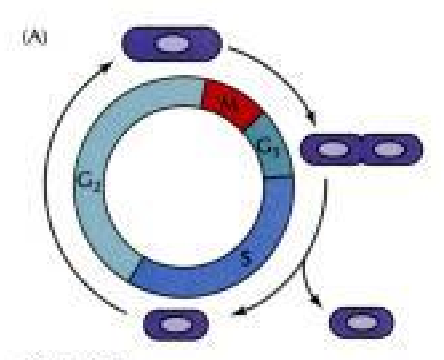


Figure 14.6
Régulation du cycle cellulaire d'une cellule animale par les facteurs de croissance. La richesse en facteurs de croissance gouverne le cycle d'une cellule animale en un point de la fin de G_1 appelé point de restriction. Si les facteurs de croissance font défaut pendant la phase G_1, la cellule se met au repos, dans une phase du cycle appelé G_0.



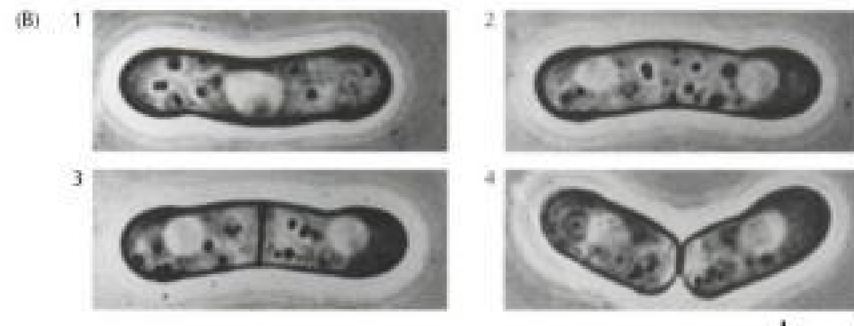
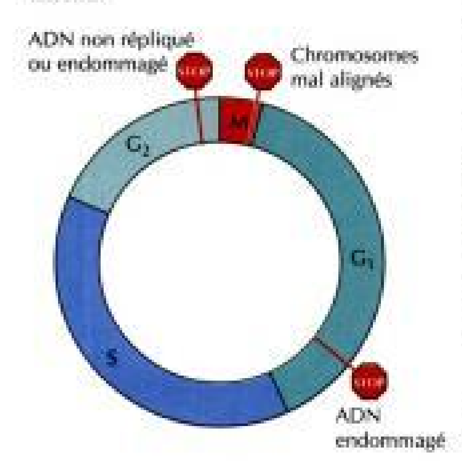


Figure 14.7
Cycle cellulaire d'une levure scissipare (A) Une levure *scissipare* croît par allongement de ses deux pôles et se divise par formation d'une cloison médiane. Contrairement au cycle cellulaire d'une levure bourgeonnante, celui de cette levure possède les phases G_1, S, G_2 et M habituelles. Notez que la cytocinèse a lieu en G_1. La longueur de la cellule est un reflet de la phase du cycle. (B) Micrographies optiques montrant les stades successifs de la mitose et de la cytocinèse chez *Schizosaccharomyces pombe*. (B, aimablement transmis par C. F. Robinow, University of Western Ontario).

le point de restriction, la cellule s'engage à parcourir la phase S et le reste du cycle cellulaire, même si elle n'est plus sous l'influence des facteurs de croissance stimulants. Si, par contre, le milieu est dépourvu des facteurs de croissance appropriés quand la cellule est en G_1, la cellule parcourra le cycle sans dépasser le point de restriction ; elle s'engage alors dans un état de quiescence appelé G_0, dans lequel elle peut rester pendant longtemps sans proliférer. Toute cellule en G_0 possède un métabolisme très actif, mais son métabolisme protéique est réduit et sa croissance est interrompue. Rappelons que de nombreuses cellules animales restent en phase G_0 jusqu'à ce que des facteurs de croissance ou d'autres signaux extracellulaires les poussent à proliférer de nouveau ; c'est le cas des fibroblastes cutanés, au repos en G_0, qui se remettront à proliférer pour réparer un déficit tissulaire dû à une lésion. La prolifération de ces cellules est enclenchée par le facteur de croissance plaquettaire, libéré par les plaquettes au cours de la coagulation sanguine et qui donne le signal de multiplication aux fibroblastes bordant le tissu lésé.

Bien que la prolifération de la plupart des cellules se décide principalement en G_1, on connaît des cellules chez lesquelles cette décision a lieu en G_2. Ce type de cycle cellulaire existe chez la levure *Saccharomyces pombe*, qui se reproduit par scission médiane (figure 14.7). Contrairement à celui de *S. cerevisiae*, le cycle cellulaire de *S. pombe* est régi par une commande sur la transition de G_2 en M, le point crucial où la disponibilité alimentaire et la taille cellulaire sont jaugées. Chez les animaux, le premier exemple de cycle dont le parcours se décide en G_2 est celui de l'ovocyte ; celui des vertébrés peut arrêter son parcours en G_2 pour un temps prolongé (plusieurs décennies chez l'Homme), jusqu'à ce que leur passage à la phase M soit enclenché par une stimulation hormonale. Il arrive donc qu'un signal extracellulaire régisse la prolifération d'une cellule au moment où celle-ci passe de G_2 en M aussi bien qu'au moment de la transition G_1/S du cycle cellulaire.

Figure 14.8
Points de contrôle du cycle cellulaire. Il existe plusieurs points de contrôle qui garantissent que les génomes transmis aux cellules filles sont complets. Un point de contrôle primordial suspend le cycle en G_2 quand l'ADN a été endommagé ou n'est pas complètement répliqué. La présence d'ADN endommagé suspend aussi le cycle en un point de contrôle situé en G_1. Un autre point de contrôle suspend la mitose durant la phase M si les chromosomes fils ne sont pas alignés correctement sur l'équateur du fuseau.



Points de contrôle du cycle

Les points de décision que nous venons de décrire régissent le parcours du cycle cellulaire en se référant à la taille de la cellule et à des signaux extracellulaires, comme certains facteurs de croissance et la richesse en nutriments. En outre, les divers événements qui ont lieu à chaque phase du cycle cellulaire doivent être subordonnés les uns aux autres, de façon qu'ils s'enclenchent dans l'ordre approprié. Il est par exemple crucial que la cellule n'entre pas en mitose avant d'avoir répliqué son génome en entier, sinon la division sera néfaste, puisque les cellules filles n'hériteront pas d'un exemplaire complet du matériau génétique. Dans la plupart des cellules, cette coordination entre les phases successives du cycle cellulaire dépend d'un système de points de contrôle et de boucles de régulation qui empêchent la cellule de passer à une phase du cycle avant d'avoir complété les événements de la phase précédente du cycle.

Plusieurs points de contrôle ont pour rôle de s'assurer que des chromosomes incomplets ou endommagés ne se répliquent et ne soient légués aux cellules filles (figure 14.8). L'un des points de contrôle les mieux connus se

trouve en G_2 et empêche que la mitose ne démarre avant la réplication complète de l'ADN. Ce point de contrôle G_2 guette la présence d'ADN non répliqué et donne à la cellule l'ordre de mettre son cycle au repos ; en empêchant que la phase M ne s'amorce avant la fin de la phase S, le point de contrôle G_2 donne à la cellule le temps de répliquer son génome en entier. Ceci fait, le blocage du cycle en G_2 est levé et la cellule entame sa mitose et répartit ses chromosomes complètement doublés aux cellules filles.

Le poursuite du cycle cellulaire s'interrompt aussi au point de contrôle G_2 si l'ADN a été endommagé, notamment par irradiation ; cette interruption est mise à profit pour réparer le dommage survenu dans l'ADN, au lieu de répartir celui-ci aux cellules filles. Il existe des mutants de levure incapables d'interrompre leur cycle en G_2 quand l'ADN n'est que partiellement répliqué ou a subi des lésions : dans les deux cas c'est donc le même point de contrôle qui bloque le cycle en G_2. Nous ignorons encore le mécanisme moléculaire qui suspend le cycle en G_2 en réponse à des signaux issus d'un ADN non répliqué ou endommagé.

Les lésions infligées à l'ADN ne suspendent pas seulement le cycle cellulaire en G_2 mais aussi en un point de contrôle situé en G_1 ; en permettant à la cellule de réparer ces lésions avant d'entrer en phase S, cette interruption évite la réplication d'un ADN endommagé. Chez les mammifères, l'arrêt au point de contrôle G_1 est dû à une protéine appelée **p53**, dont l'expression est induite dès que l'ADN subi des lésions (figure 14.9). Il est remarquable que le gène codant p53 soit fréquemment muté dans les tumeurs humaines ; comme le dysfonctionnement de p53 dû à ces mutations empêche la cellule d'interrompre son cycle en G_1 en présence d'ADN endommagé, ce dernier se réplique avec ses défauts et est transmis aux cellules filles. Ceci y accroît la fréquence des mutations et rend le génome de ces cellules instable, ce qui contribue à leur tendance à devenir cancéreuses. Les altérations qu'on retrouve le plus souvent dans les tumeurs humaines (voir chapitre 15) sont des mutations du gène *p53* ; ceci montre l'importance du bon déroulement du cycle cellulaire chez les organismes pluricellulaires.

Un autre point de contrôle majeur dont dépend l'intégrité du génome se situe vers la fin de la mitose (voir figure 14.8). Ce point de contrôle vérifie qu'au moment de l'alignement des chromosomes sur le fuseau mitotique chaque cellule fille recevra équitablement un jeu complet de chromosomes ; il suffit que l'un ou l'autre chromosome n'aille pas s'aligner correctement dans le fuseau pour que la mitose s'interrompe à la métaphase, c'est-à-dire avant que les chromosomes nouvellement répliqués ne constituent les noyaux des cellules filles ; ce point de contrôle empêche donc que la répartition des chromosomes ne s'opère tant que le jeu de chromosomes destiné à chaque cellule fille n'est pas au complet.

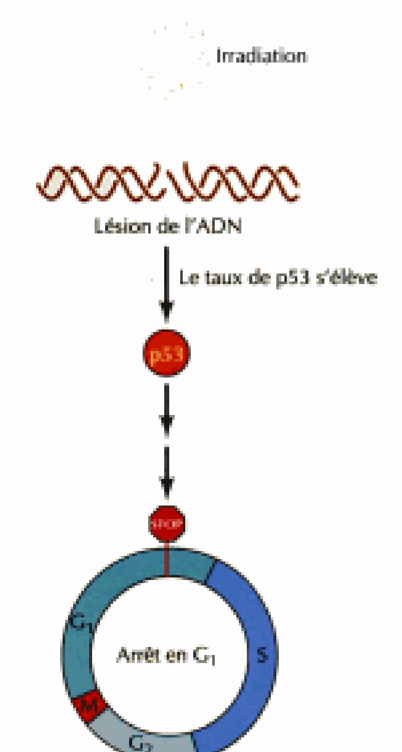


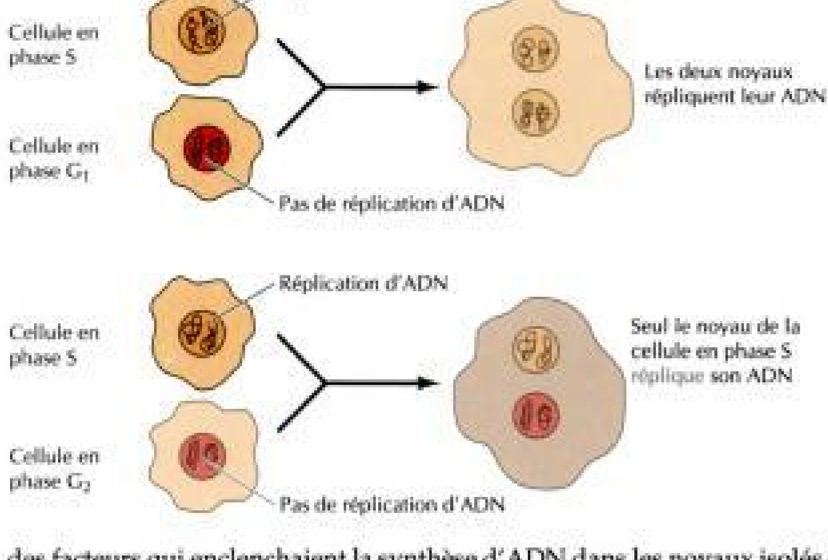
Figure 14.9
Rôle de p53 dans l'arrêt en G_1 dû à une lésion de l'ADN. Toute lésion subie par l'ADN, notamment par irradiation, fait monter rapidement le taux de p53 dans la cellule. La protéine p53 commande alors l'arrêt du cycle cellulaire au point de contrôle G_1.

Couplage de la phase S à la phase M

Comme le point de contrôle siégeant en G_2 suspend la mitose jusqu'à ce que la phase S se termine, jamais un chromosome incomplet n'est légué aux cellules filles. D'autre part, il est crucial que le génome ne se réplique qu'une seule fois par cycle cellulaire ; pour ce faire, certains mécanismes de surveillance empêchent qu'une nouvelle phase S s'amorce avant la mitose. Ces points de contrôle empêchent les cellules en G_2 de réamorcer une phase S, en postposant la prochaine salve de réplication d'ADN jusqu'après la mitose, moment où la cellule entame la phase G_1 du prochain cycle cellulaire.

Les premiers indices d'un lien causal entre la phase S et la phase M vinrent d'expériences de fusion cellulaire effectuées par Potu Rao et Robert Johnson en 1970 (figure 14.10). Ces chercheurs isolèrent des cellules à chaque phase du cycle cellulaire et fusionnèrent ces cellules les unes aux autres pour obtenir des cellules hybrides. Quand ils fusionnaient des cellules en G_1 à des cellules en phase S, les noyaux G_1 se mettaient immédiatement à synthétiser de l'ADN ; le cytoplasme des cellules en phase S devait donc contenir

Figure 14.10
Expérience de fusion cellulaire montrant que la phase S est asservie à la phase M du cycle cellulaire. On a fusionné des cellules en phase S avec des cellules en phase G_1 ou avec des cellules en phase G_2. Quand on fusionne des cellules en phase G_1 avec des cellules en phase S, le noyau de la cellule en phase G_1 se met à répliquer son ADN. Par contre, si on fusionne des cellules en phase G_2 avec des cellules en phase S, seul le noyau de la cellule en phase S continue à répliquer son ADN. Ceci prouve qu'un noyau G_2 doit parcourir sa phase M et amorcer une phase G_1 avant d'entreprendre une autre réplication d'ADN.



des facteurs qui enclenchaient la synthèse d'ADN dans les noyaux isolés de cellules en G_1. En fusionnant des cellules en phase G_2 du cycle avec des cellules en phase S, ces expérimentateurs obtenaient un résultat tout autre : le noyau G_2 n'était pas capable d'amorcer une synthèse d'ADN en présence d'un cytoplasme de cellule en phase S. On devait en conclure que la synthèse d'ADN dans un noyau en G_2 était postposée par un mécanisme qui bloquait toute nouvelle réplication jusqu'à ce que la mitose ait eu lieu. Un « facteur permissif » autorisant la réplication d'ADN devait donc être fixé aux chromosomes durant la mitose ; ce facteur est rendu inerte pendant la réplication et ne vient occuper le noyau qu'au moment où son enveloppe s'est démembrée, pendant la phase M ; ceci postpose toute nouvelle réplication d'ADN jusqu'au prochain cycle cellulaire ; on ignore le mécanisme moléculaire de cet ajustement.

SURVEILLANCE DE LA MARCHE DU CYCLE CELLULAIRE

Une des plus grandes avancées de la décennie passée est la découverte des mécanismes moléculaires qui régissent le passage de la cellule eucaryotique aux diverses étapes du cycle mitotique. Notre conception du cycle cellulaire s'est formée à partir d'un concours de résultats d'expériences effectuées sur toutes sortes d'organismes, notamment les levures, les oursins, la grenouille et les mammifères. Ces travaux ont montré que le cycle cellulaire de tous les eucaryotes est gouverné par un lot bien conservé de protéine kinases, qui enclenchent le franchissement des principaux points de transition du cycle cellulaire.

MPF : un dimère composé de Cdc2 et de cycline

Les molécules responsables de la régulation du cycle cellulaire furent identifiées grâce à trois sortes d'approches expérimentales originales. La première est l'étude de l'ovocyte de grenouille (figure 14.11) ; quand on le

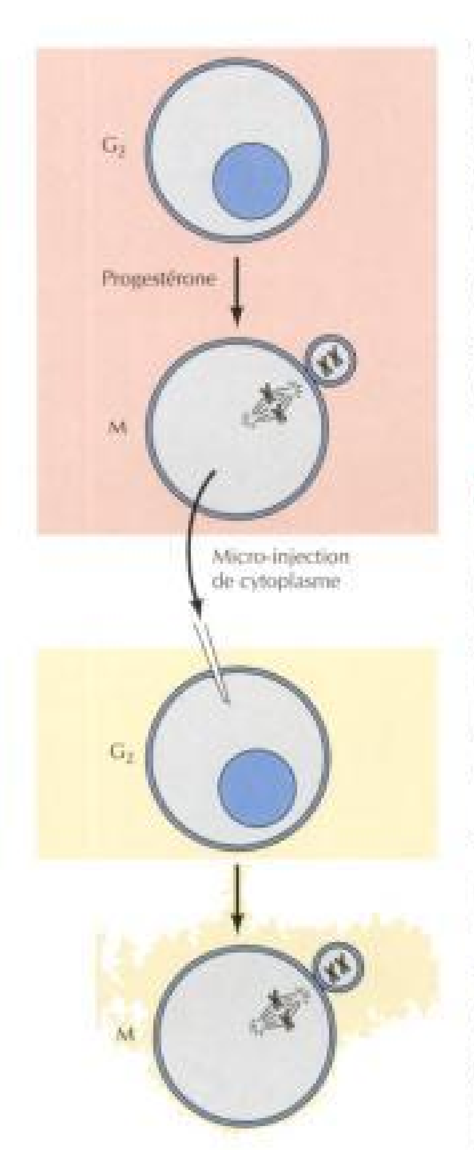


Figure 14.11
Identification de MPF. L'ovocyte de grenouille se trouve à la phase G_2 du cycle cellulaire ; il faut de la progestérone pour le faire entrer dans la phase M de la méiose. Dans l'expérience schématisée ici, on injecte, dans des ovocytes en phase G_2 du cycle, du cytoplasme extrait d'ovocytes qui ont déjà passé de G_2 en M. Ce transfert de cytoplasme provoque le passage des ovocytes de G_2 à la phase M en l'absence de stimulation hormonale ; ceci prouve qu'une substance présente dans le cytoplasme (MPF) suffit à induire la phase M de la méiose.

EXPÉRIENCE CLÉ



Découverte de MPF

Cytoplasmic Control of Nuclear Behavior during Meiotic Maturation of Frog Oocytes

Yoshio Masui and Clement L. Markert
Yale University, New Haven, CT
Journal of Experimental Zoology, 1971, Volume 177, Pages 129–146

Contexte

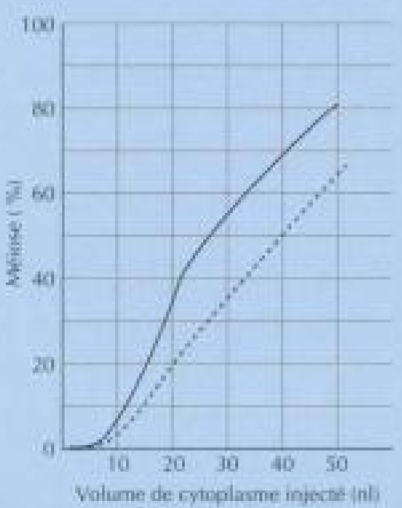
Les expériences de transplantation nucléaire et de fusion cellulaire effectuées dans le années '60 avaient montré que des noyaux introduits dans des cellules se trouvant à un stade ou l'autre du cycle cellulaire adoptent le comportement du noyau de ces cellules hôtes ; l'activité mitotique du noyau était donc sous la dépendance du cytoplasme. On attendait cependant qu'une approche expérimentale directe prouvât l'existence de facteurs cytoplasmiques qui gouvernent l'activité cyclique du noyau ; ceci fut démontré par les travaux de Masui et Markert, qui se mirent à la recherche des facteurs cytoplasmiques régissant le comportement du noyau méiotique de l'ovocyte de grenouille.

Plusieurs faits indiquaient que dans l'ovocyte de grenouille la méiose est régie par des facteurs cytoplasmiques ; cette méiose, notoirement, s'interrompt après la prophase de la méiose I et en traitant l'ovocyte par de la progestérone, on la remet en marche, ce qui revient à faire passer de G_2 en M le cycle d'une cellule somatique. Ces ovocytes subissent ensuite un second arrêt de cycle à la métaphase de la méiose II, stade où ils restent jusqu'à ce qu'ils soient fécondés. Masui et Markert émirent l'hypothèse que l'influence du traitement hormonal et de la fécondation sur le comportement du noyau se manifestaient par le truchement de modifications cytoplasmiques ; ils mirent leur hypothèse à l'épreuve en transférant à des ovocytes non stimulés du cytoplasme d'ovocytes qui avaient subi une stimulation hormonale. Ces expériences montrèrent qu'un facteur cytoplasmique, baptisé facteur promoteur de la maturation (MPF) était responsable de l'induction d'une méiose relancée par l'hormone.

Preuve expérimentale

Grâce à sa grande taille et à sa capacité de supporter l'introduction d'une micropipette de verre, l'ovocyte de grenouille se révéla le système expérimental idéal pour déceler l'activité de facteurs cytoplasmiques. La stratégie de Masui et Markert fut de prélever du cytoplasme à des ovocytes traités par de la progestérone et de vérifier qu'il pouvait relancer la méiose quand ils l'injectaient à doses croissantes à des ovocytes non traités. Ces chercheurs observèrent que le cytoplasme prélevé aux ovocytes au moins six heures après le traitement hormonal relançait la méiose des ovocytes receveurs (voir la figure) ; par contre, l'injection de cytoplasme de référence (d'ovocytes non traités par de la progestérone) restait sans effet sur les ovocytes receveurs. Le cytoplasme des ovocytes traités contenait donc un facteur capable de relancer la méiose dans les ovocytes receveurs n'ayant jamais été en contact avec la progestérone.

Des contre-essais, notamment l'injection de progestérone dans l'ovocyte receveur, exclurent toute possibilité que la progestérone fût par elle-même le facteur inducteur de méiose. Seule l'hormone introduite dans le milieu d'incubation est efficace, ce qui montre que l'hormone agit à la surface de la cellule avant de rendre actif un facteur cytoplasmique singulier. Des expériences parallèles effectuées indépendamment par Dennis Smith et Robert Ecker (The interaction of steroids with *Rana pipiens* oocyte in the induction of maturation. *Dev. Biol.* **25**:232-247, 1971) aboutirent à la même conclusion. Remarquons que l'influence de la progestérone dans ce système est différente de ce qu'elle est sur la plupart des cellules, où elle diffuse à travers la membrane plasmique avant de s'attacher à un récepteur intracellulaire (voir chapitre 13). Il n'est pas douteux que dans l'ovocyte la progestérone agit à la surface cellulaire, pour activer un facteur particulier au cytoplasme de l'ovocyte. Comme on considère la relance de la méiose ovocytaire comme une



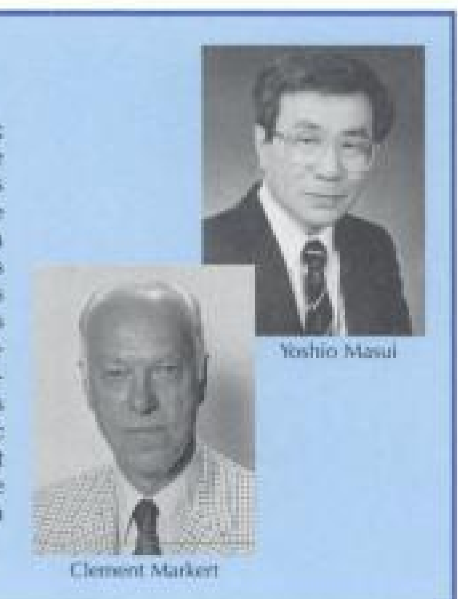
On injecte dans les ovocytes receveurs les volumes indiqués de cytoplasme d'ovocytes traités au préalable par de la progestérone. Le cytoplasme donneur est soit aspiré de la région centrale de l'ovocyte par une micropipette (ligne pleine), soit préparé par homogénéisation d'ovocytes entiers (ligne pointillée). L'ordonnée indique le pourcentage d'ovocytes injectés chez lesquels la méiose reprit sa course.

Découverte de MPF (suite)

maturation, Masui et Markert appelèrent facteur promoteur de la maturation (MPF, en anglais) le régulateur méiotique qu'ils avaient découvert.

Portée de la découverte

Une fois identifié dans l'ovocyte, on retrouva MPF dans les cellules somatiques en mitose, où il régit le passage de G_2 à M. MPF est donc le facteur général de régulation du passage au stade M aussi bien dans le cycle méiotique que dans le cycle mitotique. Couplée à la génétique des levures et aux travaux sur l'embryon d'oursin, la purification de MPF à partir d'ovocytes de grenouille en 1988 révéla l'identité de ce régulateur clé du cycle cellulaire ; MPF est un dimère de cycline B et de Cdc2, une protéine kinase. Des recherches ultérieures montrèrent que la cycline B et Cdc2 appartiennent à une grande famille, constituée d'autres cyclines et d'autres protéine kinases apparentées à Cdc2, dont les membres tiennent le rôle de MPF dans la maîtrise d'autres transitions du cycle cellulaire. La découverte de MPF dans l'ovocyte de grenouille fournit donc aux biologistes le prototype permettant de saisir la machinerie, bien conservée chez tous les eucaryotes, de régulation du cycle cellulaire.



Yoshio Masui

Clement Markert

résultats importants en étudiant *cdc2*. D'une part, le clonage moléculaire et le séquençage de *cdc2* révéla que celui-ci code une protéine kinase, premier indice du rôle primordial joué par une phosphorylation de protéine dans la régulation du cycle cellulaire ; d'autre part, on isola un gène humain apparenté à *cdc2* et on montra qu'il agit chez les levures, preuve s'il en est que ce régulateur du cycle cellulaire a gardé son activité dans toutes les espèces d'eucaryotes.

La troisième avenue de recherche qui finit par rejoindre l'identification de MPF et les résultats des études génétiques chez les levures fut l'étude des protéines synthétisées par le tout jeune embryon d'oursin. Dès la fécondation, cet embryon subi une série de divisions rapides ; or, l'incubation en présence d'inhibiteurs de la synthèse protéique prouva que ces cellules embryonnaires ne passaient à la phase M du cycle que si une nouvelle synthèse protéique avait lieu. En 1983, le groupe de Tim Hunt identifia deux protéines qui s'accumulent puis disparaissent en synchronie avec le cycle des embryons d'oursin et de moule ; le taux de ces protéines s'élève jusqu'à l'interphase, puis retombe à zéro à la fin de la mitose (figure 14.13). Hunt donna à ces protéines le nom de **cyclines** (ses deux protéines sont les cyclines A et B) et suggéra qu'elles sont des inducteurs de la mitose, leur accumulation suivie de destruction gouvernant l'entrée en phase M et la sortie de

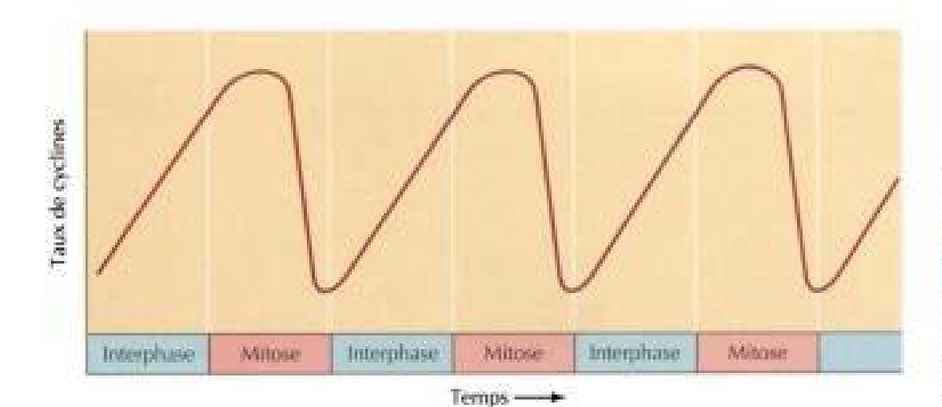


Figure 14.13
Accumulation et destruction des cyclines dans l'embryon d'oursin. On donna le nom de cyclines à des protéines qui s'accumulent tant que dure l'interphase cellulaire et sont rapidement détruites à la fin de la mitose.

Table 14.1 Inhibiteurs de Cdk

Inhibiteur	Complexe Cdk/cycline
Cellules animales	
p15, p16a	Cdk4/cycline-D Cdk6/cycline-D
p21, p27a	Cdk4/cycline-D Cdk6/cycline-D Cdk2/cycline-A Cdk2/cycline-E
Levures	
Far1	Cdc2/Cln
p40	Cdc2/Clb

[a] Les protéines p15 et p16 se ressemblent, ainsi que les protéines p21 et p27.

cette phosphorylation de Cdk, activatrice, est catalysée par l'enzyme CAK (pour Cdk-activating kinase), lui-même formé par association d'une Cdk (Cdk7) avec la cycline H. Les complexes de Cdk7 avec la cycline H s'associent aussi au facteur de transcription TFIIH, impliqué dans la réparation de l'ADN ainsi que dans la transcription effectuée par l'ARN polymérase II (voir chapitres 5 et 6). Il apparaît donc que ce membre de la famille des Cdk prend part à trois activités différentes dans la cellule, à savoir la transcription, la réparation des ADN et la régulation du cycle cellulaire.

Contrairement à la phosphorylation à effet activateur due à CAK, le troisième mécanisme régulateur des Cdk met en jeu une phosphorylation, inhibitrice, de résidus thréonine et tyrosine siégeant dans le morceau N-terminal des Cdk ; tant Cdc2 que Cdk2, notamment, sont inhibées par phosphorylation de leur thréonine 14 et de leur tyrosine 15. Elles seront de nouveau actives après déphosphorylation de ces résidus par certaines protéine phosphatases de la famille Cdc25.

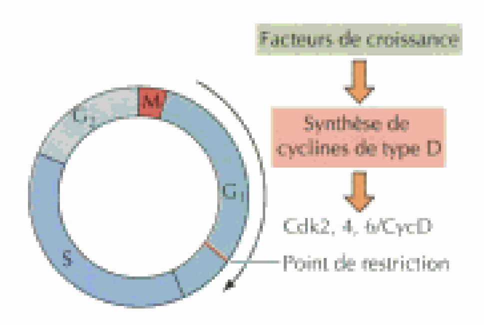
Si l'activité des Cdk est modulée par phosphorylation, elle dépend aussi de la fixation de protéines inhibitrices aux complexes Cdk/cyclines. On connaît une famille de ces **inhibiteurs de Cdk (CKI)** ; chaque membre de cette famille n'agit que sur un type déterminé de Cdk (voir tableau 14.1). Ainsi, un inhibiteur de Cdk appelé p21 se fixe à plusieurs complexes Cdk/cycline, tandis que d'autres inhibiteurs de Cdk régissent le passage en des points discrets du cycle en s'associant sélectivement à tel ou tel complexe Cdk/cycline ; c'est le cas de l'inhibiteur de Cdk p16, qui bloque spécifiquement les cellules en G_1, parce qu'il s'attache aux complexes formés entre la cycline D et les Cdk4 et Cdk6. Le pouvoir des inhibiteurs de Cdk offre donc à la cellule un moyen supplémentaire d'ajuster l'activité des Cdk. L'effet concerté de tous ces modes de régulation des Cdk permet donc à la cellule de commander le passage aux différentes étapes du cycle, suivant l'ordre reçu des points de contrôle du cycle et en accord avec toute la série de stimuli extracellulaires qui régissent la prolifération cellulaire.

Facteurs de croissance et cyclines de type D

Comme on l'a dit, la prolifération des cellules animales dépend principalement de la présence de divers facteurs de croissance extracellulaires qui commandent le franchissement du point de restriction situé à la fin de G_1 dans le cycle cellulaire. En l'absence de facteurs de croissance, la cellule est incapable de franchir ce point de restriction et se met au repos, dans un état appelé G_0, à partir duquel elle peut reprendre son cycle dès qu'elle sera stimulée par des facteurs de croissance. Ce asservissement du cycle cellulaire aux facteurs de croissance extracellulaires implique que les messageries intracellulaires mises en marche en aval des récepteurs de facteurs de croissance (décrits dans le chapitre précédent) finissent par moduler des composants de la machinerie gouvernant le cycle cellulaire.

Le lien critique entre le signal émis par un facteur de croissance et le passage à une étape du cycle cellulaire est fourni par les cyclines de type D (figure 14.18). Des cylines D sont synthétisées dès que la cellule a capté un facteur de croissance et leur synthèse persistera tant que les facteurs de croissance seront présents. Cependant, ces cyclines D sont rapidement détruites, de sorte que leur concentration dans la cellule s'effondre dès qu'on élimine ces facteurs de croissance. Pour autant que les facteurs de croissance soient présents tout au long de G_1, les complexes Cdk4/cycline-D font franchir le point de restriction à la cellule ; par contre, si les facteurs de croissance disparaissent avant que la cellule n'atteigne ce point critique du cycle, le taux de cycline D s'abaisse rapidement et les cellules ne passent plus de G_1 en S, mais se mettent au repos en G_0. Le fait que la cycline D soit inductible et rapidement renouvelable rend donc le signal émis par le facteur de croissance solidaire de la machinerie gouvernant le cycle cellulaire, ce qui

Figure 14.18
Induction de cyclines D. C'est en provoquant la synthèse de cyclines de type D que les facteurs de croissance font avancer le cycle cellulaire au-delà du point de restriction.



inhibe la prolifération pendant la phase G_1. Rappelons que les facteurs de conjugaison de levures bloquent le cycle des levures bourgeonnantes en START, ceci en induisant la production d'un inhibiteur de Cdk appelé Far1, qui invalide Cdc2 quand celui-ci est attaché aux cyclines G_1. Tout une série d'inhibiteurs de la prolifération cellulaire agissent donc en induisant des inhibiteurs de Cdk, mécanisme inverse de celui des facteurs de croissance, qui, eux, induisent la synthèse des cyclines de type D.

EVÉNEMENTS DE LA PHASE M

La phase M est la période la plus mouvementée du cycle cellulaire, car elle bouleverse profondément tous les composants cellulaires. Pendant la mitose (la division du noyau), les chromosomes se condensent, l'enveloppe nucléaire de la plupart des cellules se désagrège, le cytosquelette se réorganise en formant l'appareil mitotique et les chromosomes gagnent les pôles de la cellule. Cette ségrégation des chromosomes précède habituellement l'étranglement de la cellule (cytocinèse). Si, dans les chapitres précédents, nous avons décrit la majorité de ces événements du point de vue de la structure et de la fonction du noyau et du cytosquelette, il nous reste à considérer ces événements dans le cadre d'une vue globale de la phase M et de l'influence de MPF sur cette dernière.

Etapes de la mitose

Quoique les détails du processus de mitose varient d'un organisme à l'autre, on retrouve chez tous les eucaryotes les grandes lignes qui garantissent la répartition correcte des chromatides sœurs. Ces événements fondamentaux de la mitose comprennent la condensation de chromosomes, l'assemblage du fuseau mitotique et l'arrimage des chromosomes aux microtubules du fuseau ; ensuite, les chromatides sœurs se séparent et gagnent les pôles du fuseau, pour y former les noyaux fils.

On divise habituellement la mitose en quatre phases, **prophase, métaphase, anaphase** et **télophase**, schématisées dans les figures 14.21 et 14.22 pour la cellule animale. La prophase commence par la condensation des chromosomes, composés chacun à ce moment de deux chromatides sœurs (les molécules d'ADN filles produites pendant la phase S) ; ces deux nouvelles molécules restent enchevêtrées tout au long des phases S et G_2, pour se dégager seulement lors du processus de condensation chromatinienne. Les chromatides sœurs condensées restent soudées au niveau du **centromère**, une séquence d'ADN (voir chapitre 4) à laquelle s'attachent les protéines qui constituent le **kinétochore**, site auquel iront s'ancrer les microtubules du fuseau. Pendant qu'à la prophase les chromosomes se condensent, on voit apparaître au sein du cytoplasme des bouleversements qui préludent à l'assemblage du fuseau mitotique. Les **centrosomes** fils, formés pendant l'interphase, se séparent et gagnent chacun un pôle du noyau, pour constituer les deux pôles du **fuseau mitotique**, en cours d'assemblage à la fin de la prophase.

Chez les eucaryotes supérieurs, la fin de la prophase correspond au démembrement de l'enveloppe nucléaire. Comme on l'a mentionné au chapitre 8, le démembrement de l'enveloppe nucléaire n'est pas cependant un événement universel de la mitose ; en effet, les levures et beaucoup d'eucaryotes unicellulaires subissent une « mitose fermée », c'est-à-dire où l'enveloppe nucléaire reste intacte (voir figure 8.28) ; dans ces cellules, le corps du fuseau mitotique est noyé dans l'enveloppe nucléaire et le noyau se divise par migration des chromosomes fils aux pôles opposés du fuseau.

Quand la prophase est achevée, la cellule entre en **prométaphase**, une transition entre la prophase et la métaphase. À ce moment, les microtubules du fuseau mitotique s'attachent aux kinétochores des chromosomes condensés ; les kinétochores de deux chromatides sœurs se tournant le dos, ils vont

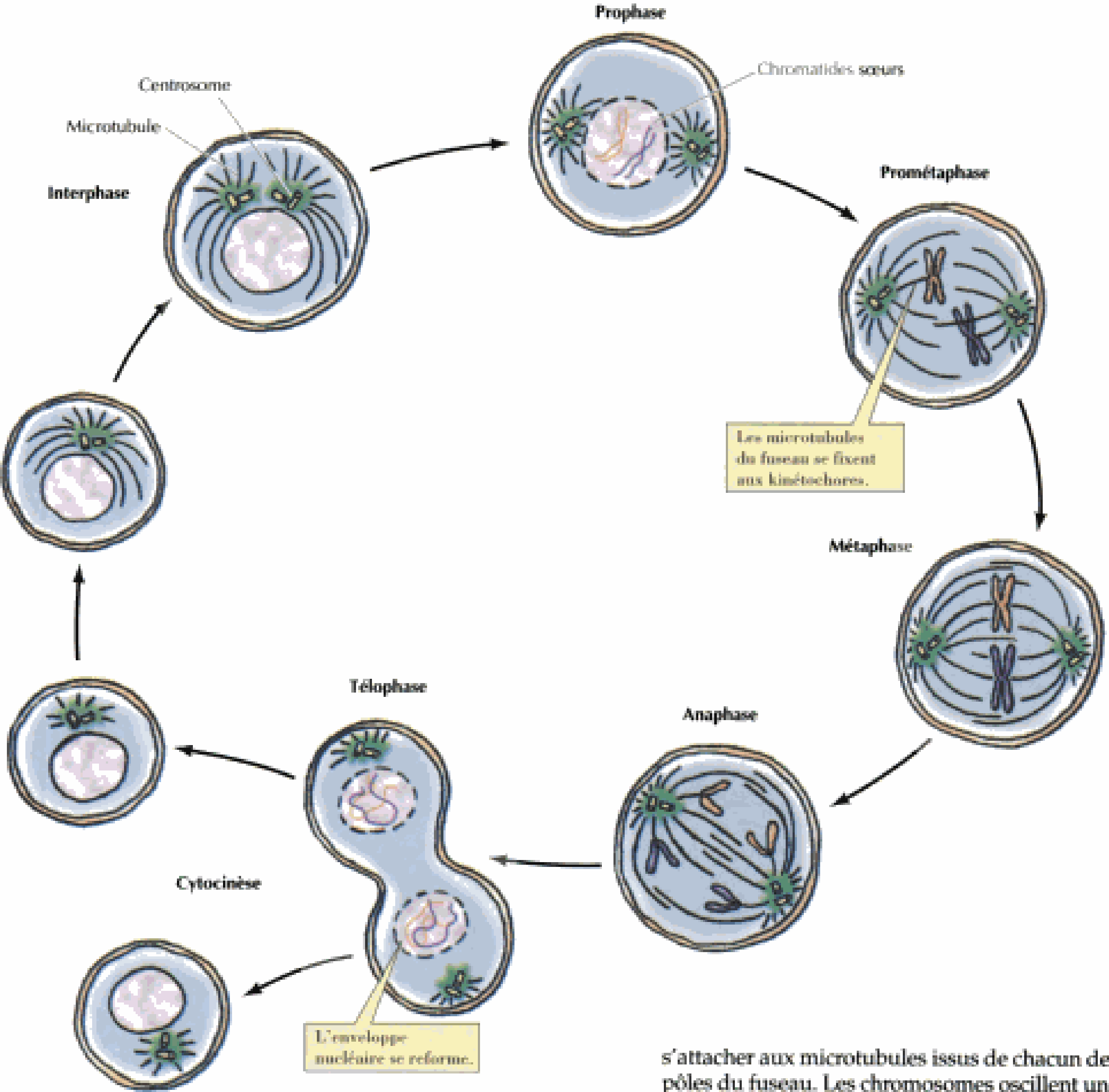


Figure 14.21
Phases de la mitose dans les cellules animales. Durant la prophase, les chromosomes se condensent et les centrosomes gagnent les pôles du noyau, ce qui amorce la formation de l'appareil mitotique. Le démembrement de l'enveloppe nucléaire permet ensuite aux microtubules de s'ancrer aux kinéchores des chromosomes. Lors de la prométaphase, les chromosomes fluent et refluent entre le centrosome et le centre de la cellule, pour finir par s'aligner sur l'équateur (métaphase). Au moment de l'anaphase, les chromatides sœurs se séparent et gagnent les pôles du noyau. La mitose prend fin avec le réassemblage de l'enveloppe nucléaire et la décondensation des chromosomes durant la télophase ; la cytocinèse produit deux cellules filles en interphase. Notez que les cellules filles reçoivent chacune un centrosome, qui va se dédoubler avant la prochaine mitose.

s'attacher aux microtubules issus de chacun des pôles du fuseau. Les chromosomes oscillent une fois vers l'avant, une fois vers l'arrière, jusqu'à ce qu'ils soient alignés sur l'équateur métaphasique au centre du fuseau. Ceci signale la fin de la métaphase.

Pour la plupart, les cellules ne s'attardent pas à la métaphase ; le passage à l'anaphase est enclenché par la rupture du lien unissant les chromatides sœurs, qui alors se séparent pour gagner les pôles du fuseau. La mitose prend fin avec la télophase, moment où les noyaux se reforment et où les chromosomes se décondensent. La cytocinèse débute habituellement à la fin de l'anaphase et est à peu près terminée à la fin de la télophase, stade où existent deux cellules filles au stade de l'interphase.

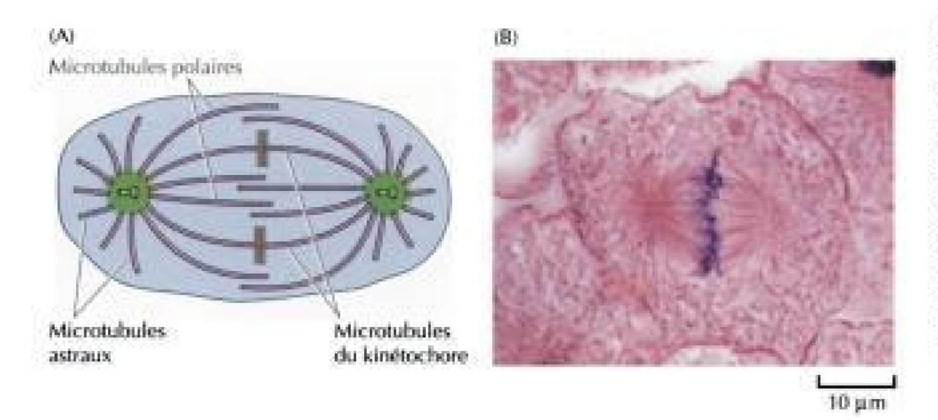


Figure 14.25
Fuseau au moment de la métaphase. (A) Le fuseau comporte trois types de microtubules : ceux du kinétochore sont attachés au chromosomes, les microtubules polaires se chevauchent au centre de la cellule et les microtubules astraux rayonnent du centrosome vers le bord de la cellule. (B) Cellule de merlan pendant le métaphase. (B, aimablement transmis par Michael Abbey / Photo Researchers, Inc)

Dès que l'enveloppe nucléaire s'est désagrégée, certains microtubules du fuseau vont de fixer au kinétochore des chromosomes (figure 14.24), ce qui amorce le processus de migration chromosomique qui caractérise la prométaphase. Parmi les protéines composant le kinétochore se trouvent les moteurs microtubulaires qui entraînent le chromosome vers le bout moins des microtubules du fuseau, arrimés, eux, au centrosome. Le glissement des chromosomes vers les pôles du fuseau est dû aussi à des moteurs protéiques siégeant dans le centrosome ; la traction de ces protéines, qui entraîne les chromosomes vers le centrosome, est contrecarrée par une force (le **vent polaire**) qui éloigne les chromosomes des pôles du fuseau ; aussi voit-on, à la prométaphase, les chromosomes aller et venir entre le centrosome et l'équateur du fuseau. On ignore la nature du vent polaire ; il serait dû soit à un allongement des microtubules du centrosome, soit à l'action de moteurs protéiques associés aux bras des chromosomes, moteurs qui entraînent les chromosomes non au bout moins, mais au bout plus des microtubules du fuseau.

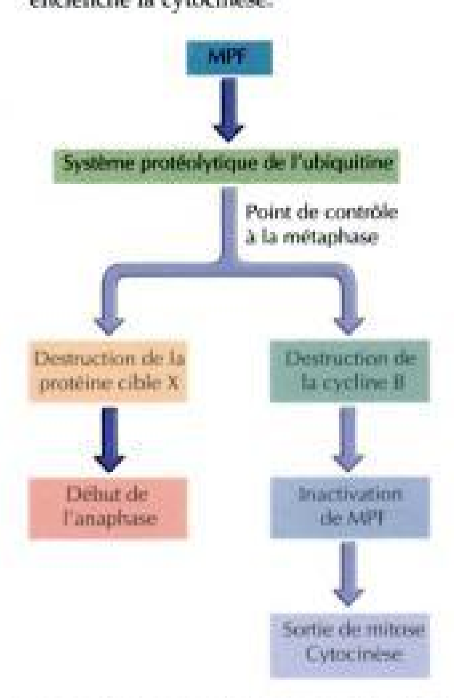
Les microtubules émanant de chacun des pôles du fuseau s'arriment au kinétochore de chacune des chromatides sœurs (chaque kinétochore siège sur une face du chromosome) ; la résultante des forces exercées sur le chromosome finit par amener le chromosome sur l'équateur du fuseau (figure 14.25). Comme on l'a vu au chapitre 11, le fuseau comprend à la fois les **microtubules kinétochoriens**, ancrés aux chromosomes, et les **mirotubules polaires**, qui se chevauchent au centre de la cellule ; en outre, il existe de courts **microtubules astraux**, qui rayonnent des centrosomes vers le bord de la cellule.

Protéolyse et inactivation de MPF : anaphase et télophase

Rappelons qu'un point de contrôle clé du cycle cellulaire sert à vérifier que les chromosomes sont bien alignés sur l'équateur du fuseau. À ce moment, la cellule commence son anaphase et termine la mitose. La passage de la métaphase à l'anaphase est dû à l'activation d'un système protéolytique basé sur l'ubiquitine (voir figure 7.40), qui détruit la cycline B et, ce faisant, invalide MPF. Comme ce système de destruction par ubiquitine interposée est induit par MPF au début de la mitose, on voit que MPF enclenche sa propre destruction ; mais l'activité protéolytique ne se met en branle que lorsque la cellule a passé le point de contrôle métaphasique, au delà duquel la mise en route du système de destruction par ubiquitine interposée provoque le passage de la métaphase à l'anaphase et la terminaison de la mitose.

Remarquons que, pour mener la mitose à son terme, la cellule ne doit pas seulement détruire sa cycline B, mais encore d'autres protéines (figure 14.26). En effet, l'anaphase n'est pas déclenchée par la destruction de la cycline B ou l'inactivation de MPF, mais par la destruction protéolytique d'une autre

Figure 14.26
Cibles du système protéolytique qui détruit la cycline B. Le système protéolytique par ubiquitine interposée, qui détruit la cycline B est mis en branle par MPF. Une fois franchi le point de contrôle métaphasique, ce système pousse la cellule de la métaphase à l'anaphase en détruisant une protéine non identifiée (X) ; il détruit aussi la cycline B, ce qui provoque l'inactivation de MPF, termine la mitose et enclenche la cytocinèse.



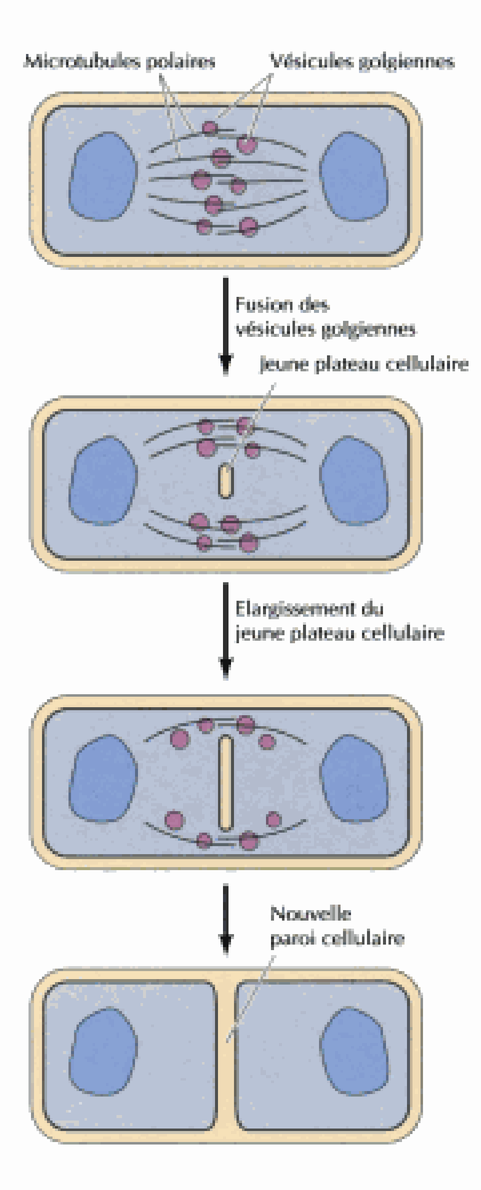


Figure 14.29
Cytocinèse chez une plante supérieure. Des vésicules golgiennes remplies de précurseurs de paroi s'attachent aux microtubules polaires à l'endroit où siégeait l'équateur métaphasique. La fusion de ces vésicules constitue une structure discoïde cerclée par une membrane (le jeune plateau cellulaire), structure qui va s'élargir et se fondre dans la membrane plasmique parentale.

entourée d'une membrane ; ses constituants polysaccharidiques s'agrègent en formant l'âme d'une nouvelle paroi cellulaire (le **plateau cellulaire**). Ce plateau s'élargit perpendiculairement au fuseau, jusqu'à atteindre la membrane plasmique, puis sa membrane fusionne avec la membrane plasmique parentale, en cloisonnant la cellule en deux entités.

MÉIOSE ET FÉCONDATION

Les cycles cellulaires que nous avons décrits dans ce chapitre produisent deux cellules filles diploïdes pourvues d'un bagage génétique identique. Par contre, la méiose est un type singulier de cycle cellulaire qui réduit de moitié le nombre de chromosomes et forme deux cellules haploïdes. Les eucaryotes unicellulaires, telles les levures, subissent soit une méiose soit une mitose ; ainsi une cellule diploïde de *Saccharomyces cerevisiae* qui subit une méiose produit des spores lorsqu'elle est soumise à des conditions défavorables à sa croissance. Chez les organismes pluricellulaires des animaux et des végétaux, seules les cellules germinales subissent la méiose, clé de la reproduction sexuée. Pendant que les cellules somatiques prolifèrent par mitose, les cellules germinales subissent la méiose, en formant des gamètes haploïdes (le spermatozoïde et l'ovule). Le développement d'un nouvel organisme commencera avec la fusion de ces gamètes au moment de la fécondation.

Étapes de la méiose

Contrairement à la mitose, la **méiose** aboutit à la division d'une cellule parentale diploïde en deux cellules haploïdes, c'est-à-dire pourvues seulement d'un jeu constitué d'un des deux chromosomes homologues présents chez le parent diploïde (figure 14.30). Cette réduction du nombre de chromosomes résulte d'une série de deux divisions nucléaires et cellulaires consécutives (la méiose I et la méiose II), qui succèdent à une seule réplication d'ADN. Comme la mitose, la méiose I s'accomplit lorsque une phase S est terminée et que les chromosomes parentaux se sont répliqués pour donner des chromatides sœurs identiques ; néanmoins, le mode de ségrégation des chromosomes lors de la méiose I diffère radicalement de celui qu'on observe à la mitose. Les chromosomes homologues méiotiques s'apparient d'abord entre eux, puis se répartissent ensuite à chacune des cellules filles ; les chromatides sœurs restent accolées, de sorte que les cellules filles produites par la méiose I ne possèdent qu'un membre (formé de deux chromatides sœurs) de chaque paire de chromosomes. La méiose I est suivie de la méiose II, qui ressemble à une mitose, puisque les chromatides sœurs s'y séparent, pour se répartir à chacune des cellules filles. Après la méiose II, il existe donc quatre cellules haploïdes, chacune pourvue d'un seul exemplaire de chaque chromosome.

L'appariement des chromosomes homologues répliqués n'est pas seulement l'élément clé de la ségrégation méiotique des chromosomes, mais il permet aussi aux chromosomes paternels de se recombiner avec les chromosomes maternels ; cet appariement critique de chromosomes a lieu pendant la longue prophase de la méiose I, que l'on divise en cinq stades (**leptotène, zygotène, pachytène, diplotène**, suivis de la **diacinèse**) selon la forme des

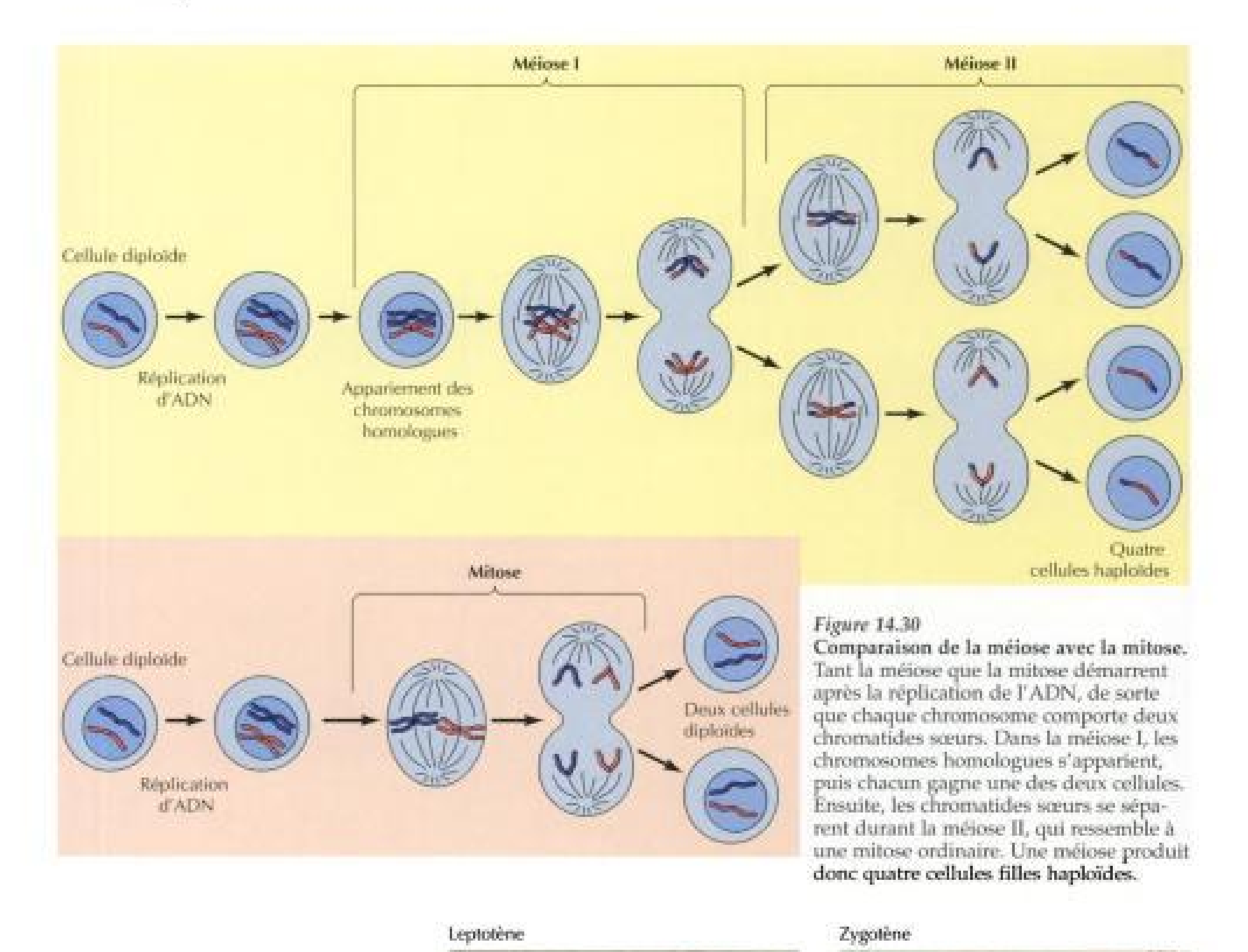


Figure 14.30
Comparaison de la méiose avec la mitose. Tant la méiose que la mitose démarrent après la réplication de l'ADN, de sorte que chaque chromosome comporte deux chromatides sœurs. Dans la méiose I, les chromosomes homologues s'apparient, puis chacun gagne une des deux cellules. Ensuite, les chromatides sœurs se séparent durant la méiose II, qui ressemble à une mitose ordinaire. Une méiose produit **donc quatre cellules filles haploïdes.**

Leptotène

Zygotène

Figure 14.31
Stades de la prophase d'une méiose I. Micrographies électroniques montrant l'aspect des chromosomes de lis (C. Hasenkampf/Biological Photo Service).

Pachytène

Diplotène

Diacinèse

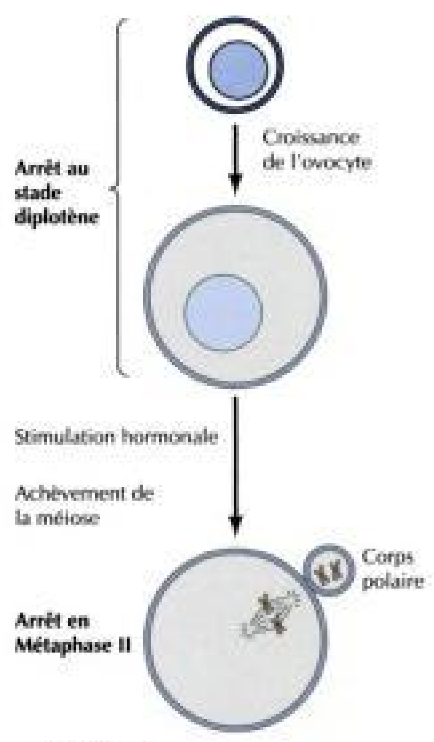


Figure 14.35
Méiose dans l'ovocyte de vertébré. La méiose s'est interrompue au stade diplotène, moment où l'ovocyte acquiert sa grande taille. Stimulé par certaines hormones, l'ovocyte reprend sa méiose, pour compléter la première division méiotique, avec cytocinèse asymétrique formant un petit corps polaire. La plupart des ovocytes de vertébré suspendent encore leur cycle à la métaphase II.

Régulation de la méiose dans l'ovocyte

On s'est avantageusement servi d'ovocytes de vertébrés pour étudier le cycle cellulaire, notamment parce que ce sont de grandes cellules, qu'il est aisé de manipuler au laboratoire ; en effet, dans l'exemple cité au début du chapitre, on a découvert MPF dans l'ovocyte de grenouille et on l'a purifié à partir d'extraits de ces cellules. Comme celle des autres espèces, la méiose de ces ovocytes est régie en deux points singuliers du cycle cellulaire et l'étude de la méiose a révélé des mécanismes insoupçonnés de régulation du cycle cellulaire.

Le premier point d'ajustement de la méiose ovocytaire se place au stade diplotène de la première division méiotique (figure 14.35). L'ovocyte peut dormir à ce stade pendant de longues périodes, soit jusqu'à 40, voire 50 ans chez l'Homme. Pendant ce repos au stade diplotène, les chromosomes ovocytaires se décondensent et sont activement transcrits ; la croissance rapide de l'ovocyte durant cette période en est la preuve. L'ovocyte humain, par exemple, arrive à un diamètre de 100 µm, qui correspond à cent fois le volume d'une cellule somatique ordinaire ; l'ovocyte de grenouille est encore plus gros, puisqu'il atteint un diamètre de 1 mm. Pendant cette période de croissance, l'ovocyte fait des réserves énormes, notamment d'ARN et de protéines, essentiels au développement précoce de l'embryon. Comme on l'a dit au début de ce chapitre, les premiers cycles cellulaires embryonnaires s'effectuent en l'absence de croissance cellulaire, puisqu'ils consistent en une rapide partition de l'ovocyte en petites cellules (voir figure 14.2).

Après un temps d'arrêt particulier à chaque espèce, l'ovocyte reprend le cours de sa méiose et se prépare à la fécondation. Chez certains animaux, l'ovocyte est au repos au stade diplotène, moment où il est fécondé, avant de poursuivre sa méiose ; mais chez la plupart des vertébrés (dont la grenouille, la souris et l'Homme), l'ovocyte, avant d'être fécondé, poursuit sa méiose jusqu'à la méiose I en réponse à une stimulation hormonale. La division cellulaire qui suit la méiose I est asymétrique, car elle produit un petit **corps polaire** et un ovocyte qui hérite de la masse de la cellule mère. Cet ovocyte entame alors sa méiose II sans avoir reconstitué son noyau ou décondensé ses chromosomes. Chez la plupart des vertébrés, l'ovocyte arrête le cours de sa maturation à la métaphase II, en attendant d'être fécondé.

La méiose de l'ovocyte est, comme la phase M de la cellule somatique, sous la commande de MPF, mais lors de la méiose de l'ovocyte, MPF induit

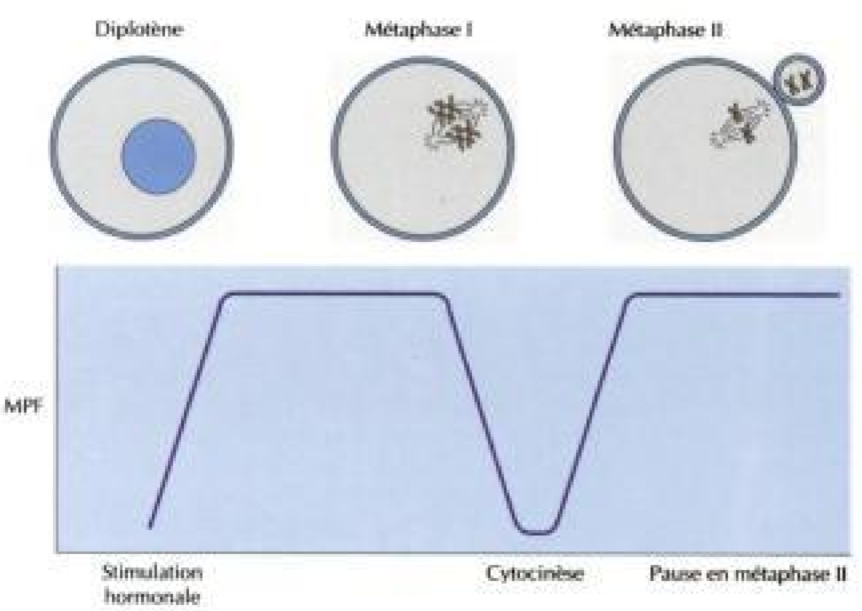


Figure 14.36
Activité de MPF au cours de la méiose ovocytaire. Une stimulation hormonale au stade diplotène active MPF et pousse l'ovocyte jusqu'à la métaphase I. L'activité de MPF décroît alors au moment du passage de la métaphase I à l'anaphase I. La méiose I terminée, MPF reprend son activité et la conserve jusqu'à la pause en métaphase II.

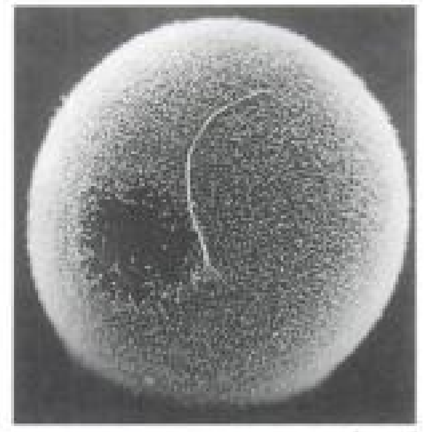


Figure 14.39
Fécondation. Spermatozoïde humain fécondant un ovocyte, vu au microscope électronique à balayage. (Cliché dû à l'amabilité de David M. Philips/Visuals Unlimited).

Le maître signal qui suit l'attachement d'un spermatozoïde à son récepteur fixé à la membrane plasmique de l'ovocyte est l'envahissement du cytoplasme de l'œuf par une onde d'ions Ca^{2+}, due, semble-t-il, à une hydrolyse de phosphatidylinositol 4,5-*bis*phosphate (voir figure 13.28). Une des suites de cette montée du taux du Ca^{2+} intracellulaire est une modification de la surface cellulaire qui empêche d'autres spermatozoïdes de pénétrer dans l'œuf ; comme l'ovocyte est d'habitude entouré d'une multitude de spermatozoïdes, cette barrière est essentielle à la formation d'une cellule parfaitement diploïde. Ces altérations de la surface de l'œuf seraient dues en partie à ce que l'onde de Ca^{2+} provoque l'exocytose de vésicules sécrétoires accumulées sous la membrane plasmique de l'œuf ; en libérant leur contenu, ces vésicules changent le manteau extracellulaire, de sorte qu'aucun spermatozoïde ne peut plus pénétrer dans l'œuf.

Cette montée de Ca^{2+} cytosolique qui suit la fécondation mène aussi la méiose à son terme (figure 14.40). Dans l'ovocyte dont le cycle est arrêté à la métaphase II, le passage de la métaphase à l'anaphase serait dû à l'activation d'un système protéolytique dépendant de Ca^{2+}, qui détruit à la fois la cycline B et Mos ; l'invalidation consécutive de MPF pousse la cellule à compléter sa seconde division méiotique, dont la cytocinèse asymétrique (comme dans la méiose I) produit l'autre petit corps polaire.

Une fois la méiose ovocytaire achevée, l'œuf fécondé (appelé à présent **zygote**) contient deux noyaux haploïdes (les **pronuclei**), fourni chacun par un des parents. Chez les mammifères, ces deux pronuclei entrent en phase S et répliquent leur ADN pendant qu'ils migrent l'un vers l'autre ; au moment où ils se touchent, le zygote aborde la phase M de sa première division mitotique ; les deux enveloppes nucléaires se désagrègent et les chromosomes condensés, paternels et maternels, s'alignent sur un équateur commun. La mitose s'achève en produisant deux cellules embryonnaires, pourvues chacune d'un nouveau génome diploïde. Ces cellules vont alors subir une série de divisions qui finiront par former un nouvel organisme.

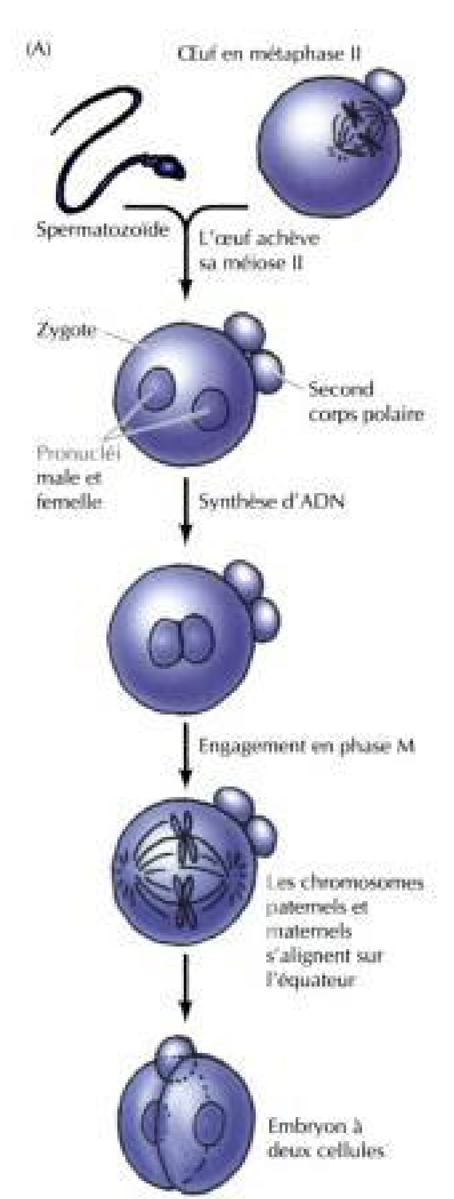


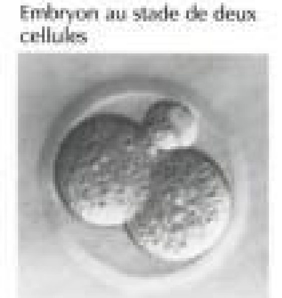
Figure 14.40
Fécondation et achèvement de la méiose. (A) En déclenchant le passage de la métaphase II à l'anaphase II, la fécondation pousse la méiose ovocytaire à son terme et l'émission d'un second corps polaire (d'habitude il dégénère). Dès que le noyau du spermatozoïde se décondense, l'œuf fécondé contient deux noyaux haploïdes (les pronuclei mâle et femelle). Chez les mammifères, les pronuclei se répliquent pendant qu'ils migrent l'un vers l'autre. Ils s'engagent alors dans une mitose, les chromosomes mâles et femelles s'alignant sur un équateur commun. L'achèvement de la mitose et la cytocinèse produisent ainsi un embryon bicellulaire dont chaque cellule possède un génome diploïde. (B) Métaphase II, zygote et embryon bicellulaire chez la souris, vus au microscope. (B, aimablement transmis par Ann A. Kiessling, Harvard Medical School).

(B) Œuf en métaphase II

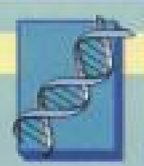
Zygote



Embryon au stade de deux cellules



MÉDECINE MOLÉCULAIRE



Fécondation in vitro

La maladie

Le besoin de se reproduire existe chez toutes les espèces animales et l'Homme n'y fait pas exception, puisque le rêve d'avoir des enfants pour fonder une famille est un des objectifs de la plupart d'entre nous. L'incapacité d'un couple à engendrer (stérilité de couple) est toujours une situation non seulement dévastatrice mais aussi très courante. Les cliniciens qualifient de subnormale la fécondité d'un couple qui n'aboutit pas à une grossesse dans les deux années de vie commune ; d'après ce critère, on considère qu'aux USA environ 20 % des couples sont sousfertiles.

La stérilité d'un couple est due à diverses causes, qui concernent l'homme ou la femme. Beaucoup sont dues à des malformations des trompes de Fallope, que les ovules doivent emprunter pour passer de l'ovaire dans l'utérus. Certaines femmes sont stériles ou presque à cause de troubles hormonaux qui empêchent leurs ovules d'atteindre une métaphase II normale. D'autres cas de stérilité totale ou relative sont dus à ce que le partenaire mâle produit ou éjacule un trop petit nombre de spermatozoïdes normaux. La fécondation *in vitro* (FIV), mise au point pour pallier les anomalies des trompes, est utilisée à présent pour traiter la stérilité, qu'elle provienne de la femme ou de l'homme.

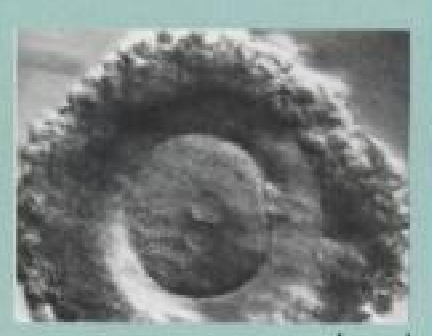
Bases moléculaire et cellulaire

L'art de la fécondation *in vitro* est de prélever à l'ovaire des ovocytes en métaphase II et de les cultiver en présence de spermatozoïdes. Après un laps de temps de 12 à 18 heures, on vérifie que la fécondation a eu lieu, en cherchant au microscope la présence de deux pronuclei. Les œufs fécondés sont alors soit replacés dans les trompes ou dans l'utérus, soit maintenus en boite de culture pendant quelques jours, le temps que se déroulent les premières divisions cellulaires de l'embryon.

La fécondation *in vitro* (FIV) fut mise au point pour pallier aux anomalies des trompes, qui représentent un obstacle mécanique à une grossesse normale, mais on l'emploie dans d'autres cas de stérilité ; on traite, par exemple, les déficiences hormonales qui empêchent l'ovule d'atteindre la métaphase II en administrant à la femme les hormones appropriées ; ce traitement aboutit à la formation de plusieurs ovules, que l'on peut féconder *in vitro*, en vue d'obtenir des œufs fécondés que l'on introduit ensuite dans l'utérus.

La FIV sert aussi à traiter des cas de stérilité dus à ce que l'éjaculation d'un trop petit nombre de spermatozoïdes bien fonctionnels par le partenaire mâle empêche la fécondation *in vivo*. D'ailleurs, quand la fécondation *in vitro* par co-culture d'ovocytes et de spermatozoïdes échoue, on peut à présent injecter un spermatozoïde directement dans un ovule (injection intracytoplasmique de spermatozoïde, ou ICSI) ; il est remarquable que quand on effectue la fécondation par ce procédé on doit aussi stimuler la surface de l'ovule pour amorcer son activation.

Le taux de réussite de la fécondation *in vitro* approche de celui de la fécondation *in vivo*. On estime que 25 % des ovules humains descendus dans les trompes aboutiront à une grossesse chez un couple normalement fécond ; on obtient le même succès par fécondation *in vitro* d'ovules de femmes jeunes souffrant d'une imperméabilité des trompes. Bien que les chances de succès soient moindres chez les femmes d'âge plus avancé ou chez les femmes souffrant de déficit hormonal, on augmente les chances de succès en plaçant dans l'utérus plusieurs œufs fécondés. L'ICSI donne aussi une chance de grossesse d'environ 25 % ; ceci suggère qu'il existe une limite intrinsèque au pouvoir qu'a l'œuf humain de donner un embryon viable, que ce soit *in vitro* ou *in vivo*.



Œuf humain fécondé *in vitro*, avec ses deux pronucléus
(Dû à l'obligeance de Ann A. Kiessling, Harvard Medical School.)

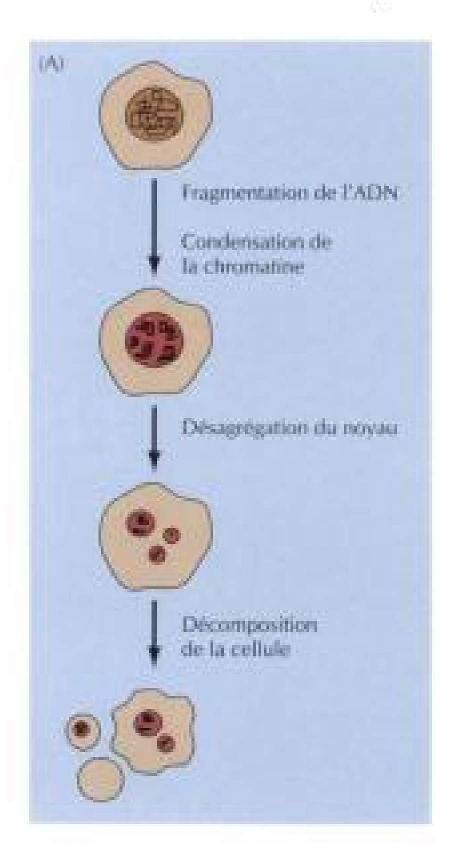
La différenciation des cellules sanguines est un bel exemple de prolifération continue de cellules souches. Il existe plusieurs types de cellules sanguines spécialisées : les érythrocytes transportent O_2 et CO_2, les granulocytes et les macrophages phagocytent les déchets, les plaquettes (des fragments de mégacaryocytes) servent à la coagulation sanguine et les lymphocytes assurent la défense immune. Ces cellules ont toutes une durée de vie limitée, allant de moins d'un jour à quelques mois ; de ce fait, elles sont sans cesse régénérées par division de cellules d'une lignée souche commune (la

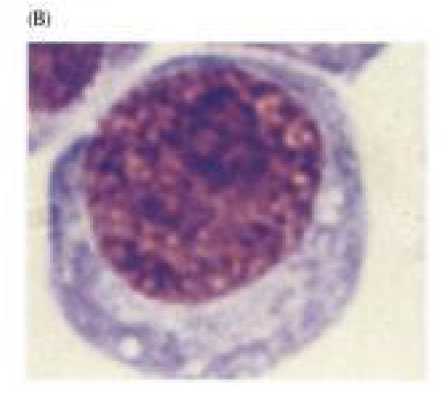
cellule souche pluripotente) habitant la moelle osseuse (figure 14.42) ; les descendants de ces cellules souches pluripotentes s'engagent ensuite dans l'une ou l'autre voie de différenciation particulière.

Ces cellules continuent de se diviser et subissent plusieurs mitoses au cours de leur différenciation, mais, dès qu'elles sont tout à fait différenciées, elles cessent de se diviser ; aussi la constance de la population de cellules sanguines différenciées dépend-elle de la prolifération continue de la lignée souche pluripotente.

Mort cellulaire programmée

On appelle **mort cellulaire programmée**, ou **suicide cellulaire**, un mode physiologique normal de mort cellulaire essentiel à l'entretien des tissus adultes et au développement de l'embryon. Chez l'organisme adulte, la mort cellulaire programmée permet d'équilibrer la prolifération cellulaire, de façon à maintenir constant le nombre de cellules des tissus soumis à renouvellement ; c'est ainsi que le corps humain se débarrasse journellement d'environ 5×10^{11} cellules sanguines, remplacées par la production continue d'autant de cellules par la moelle osseuse. De plus, la mort cellulaire programmée est un mécanisme de défense éliminant, au profit de l'organisme entier, toute cellule endommagée ou potentiellement dangereuse. Le fait que les cellules infectées par un virus meurent souvent selon un processus programmé les empêche d'engendrer de nouveaux virions et de propager l'infection à tout l'organisme hôte. D'autres types d'agression, comme une lésion de l'ADN, entraînent aussi la mort cellulaire programmée ; cette issue permet d'éliminer des cellules porteuses de mutations dommageables, notamment de mutations susceptibles de faire apparaître un cancer.





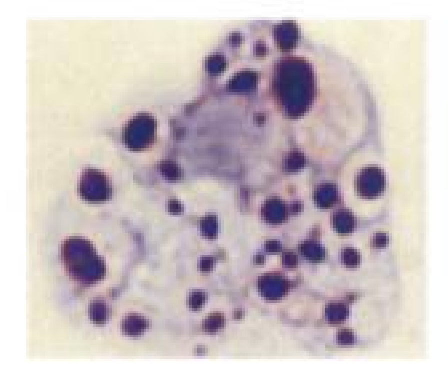


Figure 14.43
Apoptose. (A) Schéma des événements de l'apoptose. (B) Micrographie optique de cellules leucémiques humaines, normales et apoptotiques, pour montrer que la chromatine se condense et que le noyau se désagrège au cours de l'apoptose. (B, aimablement transmis par D. R. Green, La Jolla Institue for Allergy and Immunology).

QUESTIONNAIRE

1. Dans vos cellules mammaliennes en culture, qui se divisent toutes les 30 heures, la proportion de cellules en mitose est toujours de 3,3 %. Le passage d'une suspension de ces cellules au cytomètre de flux montre que 53, 3 % d'entre elles possèdent un complément d'ADN égal à $2n$, 16,7 % un complément égal à $4n$ et 30 % un complément compris entre $2n$ et $4n$. Quelle est la durée des phases G_1, S, G_2 et M du cycle de ces cellules ?

2. Le point de contrôle tombant dans la métaphase postpose l'anaphase jusqu'à ce que les chromosomes soient tous alignés correctement sur le fuseau. Qu'arriverait-il si une défaillance de ce point de contrôle laissait s'amorcer l'anaphase alors qu'un chromosome est encore arrimé aux microtubules issus d'un seul centrosome ?

3. L'inhibiteur de Cdk, p16, s'attache spécifiquement aux complexes Cdk4/cycline-D. Quelle serait l'influence d'une surexpression de p16 sur l'avancement du cycle cellulaire ? Cette surexpression de p16 influencerait-elle le comportement de cellules tumorales dépourvues de protéine Rb fonctionnelle ?

4. On a utilisé des clones d'ADNc de lamine mutée *in vitro* pour récolter des mutants qui ne peuvent plus être phosphorylés par MPF. En quoi l'expression de ces lamines mutées va-t-elle influencer le démembrement de l'enveloppe nucléaire à la fin de la prophase ?

5. On a obtenu des mutants de cycline B résistants à toute dégradation protéolytique par le système qui détruit la cycline B. En quoi l'expression de ces cyclines B mutées influencera-t-elle les événements qui marquent le passage de la métaphase à l'anaphase ?

6. On a pu, par recombinaison homologue, invalider le gène *mos* d'une lignée de souris. Quelle conséquence cela aura-t-il sur la méiose des ovocytes de cette lignée ?

POUR EN SAVOIR PLUS

Références générales

Murray, A. and T. Hunt. 1993. *The Cell Cycle: An Introduction*. New York: W. H. Freeman.

Le cycle cellulaire des eucaryotes

Baserga, R. 1985. *The Biology of Cell Reproduction*. Cambridge, MA: Harvard University Press.

Forsburg, S. L. and P. Nurse. 1991. Cell cycle regulation in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Ann. Rev. Cell Biol.* 7: 227–256. [R]

Hartwell, L. H. and M. B. Kastan. 1994. Cell cycle control and cancer. *Science* 266: 1821–1828. [R]

Hartwell, L. H. and T. A. Weinert. 1989. Checkpoints: Controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 246: 629–634. [R]

Murray, A. W. 1992. Creative blocks: Cell-cycle checkpoints and feedback controls. *Nature* 359: 599–604. [R]

Norbury, C. and P. Nurse. 1992. Animal cell cycles and their control. *Ann. Rev. Biochem.* 61: 441–470. [R]

Nurse, P. 1994. Ordering S phase and M phase in the cell cycle. *Cell* 79: 547–550. [R]

Pardee, A. B. 1989. G_1 events and the regulation of cell proliferation. *Science* 246: 603–608. [R]

Rao, P. N. and R. T. Johnson. 1970. Mammalian cell fusion studies on the regulation of DNA synthesis and mitosis. *Nature* 225: 159–164. [P]

Su, T. T. S., P. J. Follette and P. H. O'Farrell. 1995. Qualifying for the license to replicate. *Cell* 81: 825–826. [R]

Régulateurs du cycle cellulaire

Ait-Si-Ali, S. *et al.* 1998. Histone acetyltransferase activity of CBP is controlled by cycle-dependent kinases and oncoprotein E1A. *Nature* **396** :184-186.[O]

Beach, D., B. Durkacz and P. Nurse. 1982. Functionally homologous cell cycle control genes in budding and fission yeast. *Nature* 300: 706–709. [P]

Cayrol, C. et Ducommun, B. 1997. Interaction entre l'inhibiteur des kinases dépendantes des cyclines p21 et le PCNA : un lien entre le cycle cellulaire, la réplication et la réparation de l'ADN. *Médecine/Sciences* **13**.

Evans, T., E. T. Rosenthal, J. Youngbloom, D. Distel and T. Hunt. 1983. Cyclin: A protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* 33: 389–396. [P]

Hartwell, L. H., R. K. Mortimer, J. Culotti and M. Culotti. 1973. Genetic control of the cell division cycle in yeast: V. Genetic analysis of *cdc* mutants. *Genetics* 74: 267–287. [P]

Heichman, K. A. and J. M. Roberts. 1994. Rules to replicate by. *Cell* 79: 557–562. [R]

Hunter, T. and J. Pines. 1994. Cyclins and cancer II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell* 79: 573–582. [R]

King, R. W., P. K. Jackson and M. W. Kirschner. 1994. Mitosis in transition. *Cell* 79: 563–571. [R]

Kirschner, M. 1992. The cell cycle then and now. *Trends Biochem. Sci.* 17: 281–285. [R]

La Thangue, N. B. 1994. DRTF1/E2F: An expanding family of heterodimeric transcription factors implicated in cell-cycle control. *Trends Biochem. Sci.* 19: 108–114. [R]

Lohka, M. J., M. K. Hayes and J. L. Maller. 1988. Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 3009–3013. [P]

Masui, Y. and C. L. Markert. 1971. Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J. Exp. Zool.* 177: 129–146. [P]

Morgan, D. O. 1995. Principles of CDK regulation. *Nature* 374: 131–134. [R]

Murray, A. 1995. Cyclin ubiquitination: The destructive end of mitosis. *Cell* 81: 149–152. [R]

Peter, M. and I. Herskowitz. 1994. Joining the complex: Cyclin-dependent kinase inhibitory proteins and the cell cycle. *Cell* 79: 181–184. [R]

Riley, D. J., E. Y.-H. Lee and W.-H. Lee. 1994. The retinoblastoma gene: More than a tumor suppressor. *Ann. Rev. Cell Biol.* 10: 1–29. [R]

Sherr, C. J. 1994. G1 phase progression: Cycling on cue. *Cell* 79: 551–555. [R]

Sherr, C. J. 1995. D-type cyclins. *Trends Biochem. Sci.* 20: 187–190. [R]

Smith, L. D. and R. E. Ecker. 1971. The interaction of steroids with *Rana pipiens* oocytes in the induction of maturation. *Dev. Biol.* 25: 232–247. [P]

Swenson, K. I., K. M. Farrell and J. V. Ruderman. 1986. The clam embryo protein cyclin A induces entry into M phase and the resumption of meiosis in *Xenopus* oocytes. *Cell* 47: 861–870. [P]

Weinberg, R. A. 1995. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81: 323–330. [R]

Weinert, T. 1998. DNA damage and checkpoint pathways : molecular anatomy and interactions with repair. *Cell* **94** :555-558.[R]

Woo, R. A. *et al.* 1998. DNA-dependent protein kinase acts upstream of p53 in response to DNA damage. *Nature* **394** :700-704.[O] Comm. p. 616.

Evénements de la phase M

Earnshaw, W. C. and A. F. Pluta. 1994. Mitosis. *BioEssays* 16: 639–643. [R]

Fuller, M. T. 1995. Riding the polar winds: Chromosomes motor down east. *Cell* 81: 5–8. [R]

Holloway, S. L., M. Glotzer, R. W. King and A. W. Murray. 1993. Anaphase is initiated by proteolysis rather than by the inactivation of maturation-promoting factor. *Cell* 73: 1393–1402. [P]

Holm, C. 1994. Coming undone: How to untangle a chromosome. *Cell* 77: 955–957. [R]

Karsenty, E. et Vernos, I. 1996. Construire le squelette des cellules (fuseau). *La Recherche* 292 :34-36. [R]

King, R. W., P. K. Jackson and M. W. Kirschner. 1994. Mitosis in transition. *Cell* 79: 563–571. [R]

Kirschner, M. 1992. The cell cycle then and now. *Trends Biochem. Sci.* 17: 281–285. [R]

Koshland, D. 1994. Mitosis: Back to the basics. *Cell* 77: 951–954. [R]

McIntosh, J. R. and G. E. Hering. 1991. Spindle fiber action and chromosome movement. *Ann. Rev. Cell Biol.* 7: 403–426. [R]

McIntosh, J. R. and M. P. Koonce. 1989. Mitosis. *Science* 246: 622–628. [R]

Murray, A. 1995. Cyclin ubiquitination: The destructive end of mitosis. *Cell* 81: 149–152. [R]

Peterson, C. L. 1994. The SMC family: Novel motor proteins for chromosome condensation? *Cell* 79: 389–392. [R]

Rieder, C. L. and E. D. Salmon. 1994. Motile kinetochores and polar ejection forces dictate chromosome position on the vertebrate mitotic spindle. *J. Cell Biol.* 124: 223–233. [R]

Staehelin, L. A. and P. K. Hepler. 1996. Cytokinesis in higher plants. *Cell* 84: 821–824. [R]

Warren, G. 1993. Membrane partitioning during cell division. *Ann. Rev. Biochem.* 323–348. [R]

Méïose et fécondation

Austin, C. R. and R. V. Short, eds. 1982. *Reproduction in Mammals I. Germ Cells and Fertilization*, 2d ed. Cambridge, England: Cambridge University Press.

Cans, Ch. *et al.* 1998. Les phosphatases Cdc25 : régulateurs du cycle cellulaire et oncogènes potentiels. *Médecine/Sciences* **14** :269-273.[R]

Carpenter, A. T. C. 1994. Chiasma function. *Cell* 77: 959–962. [R]

Denis, H. 1996. Cytosquelette et polarité ovulaire. *Médecine/Sciences* **12** :1145.

Gilbert, S. F. 1994. *Developmental Biology*, 4th ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates.

Hawley, R. S. and T. Arbel. 1993. Yeast genetics and the fall of the classical view of meiosis. *Cell* 72: 301–303. [R]

Jan, Y. N. et Jan, L. Y. 1998. Asymmetric cell division. *Nature* **392** :775-778.[R]

Longo, F. J. 1987. *Fertilization*. London: Chapman and Hall.

McKim, K. S. and R. S. Hawley. 1995. Chromosomal control of meiotic cell division. *Science* 270: 1595–1601. [R]

Moens, P. B. 1994. Molecular perspectives of chromosome pairing at meiosis. *BioEssays* 16: 101–106. [R]

Orr-Weaver, T. L. 1995. Meiosis in *Drosophila*: Seeing is believing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 10443–10449. [R]

Roeder, G. S. 1995. Sex and the single cell: Meiosis in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 10450–10456. [R]

Sagata, N. 1996. Meiotic metaphase arrest in animal oocytes: Its mechanisms and biological significance. *Trends Cell Biol.* 6: 22–28. [R]

Snell, W. J. and J. M. White. 1996. The molecules of mammalian fertilization. *Cell* 85: 629–637. [R]

Wakayama, T. *et al.* 1998. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* **394** :369-74. Clonage de la souris.[O]

Wassarman, P. M. 1987. The biology and chemistry of fertilization. *Science* 235: 553–560. [R]

Wilmut, I. *et al.* 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* **385** :810. (Mouton Dolly, obtenu par clonage)[O]

Organogenèse, différenciation et suicide cellulaire

Ameisen, J.-C. 1996. Le suicide des cellules. *Pour la Science* n°224 :52-59.[R]

Baserga, R. 1985. *The Biology of Cell Reproduction*. Cambridge, MA: Harvard University Press.

Enari, M. *et al.* 1998. A caspase-activated DNAase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* **391** :43-50.[O].

Fawcett, D. W. 1994. *Bloom and Fawcett: A Textbook of Histology*, 12th ed. New York: Chapman and Hall.

Green, D. R. 1998. Apoptotic pathways : the road to ruin. *Cell* **94** :695-698.[R]

Hengartner, M. O. and H. R. Horvitz. 1994. Programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 4: 581–586. [R]

Herbein, G. *et al.* 1998. Apoptosis of $CD8^+$ T cells is mediated by macrophages through interaction of HIV gp120 with chemokine receptor CXCR4. *Nature* **395** :189.[O] + p 117.

Korsmeyer, S. J. 1995. Regulators of cell death. *Trends Genet.* 11: 101–105. [R]

Kumar, S. 1995. ICE-like proteases in apoptosis. *Trends Biochem. Sci.* 20: 198–202. [R]

Litwak, G. (ed.) 1997. Apoptosis. *Vitamins and Hormones* **53**. Volume entier sur le sujet.

Martin, S. J. and D. R. Green. 1995. Protease activation during apoptosis: Death by a thousand cuts? *Cell* 82: 349–352. [R]

Martin, S. J., D. R. Green and T. G. Cotter. 1994. Dicing with death: Dissecting the components of the apoptosis machinery. *Trends Biochem. Sci.* 19: 26–30. [R]

Metcalf, D. 1992. Hemopoietic regulators. *Trends Biochem. Sci.* 17: 286–289. [R]

Raff, M. C. 1992. Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 356: 397–400. [R]

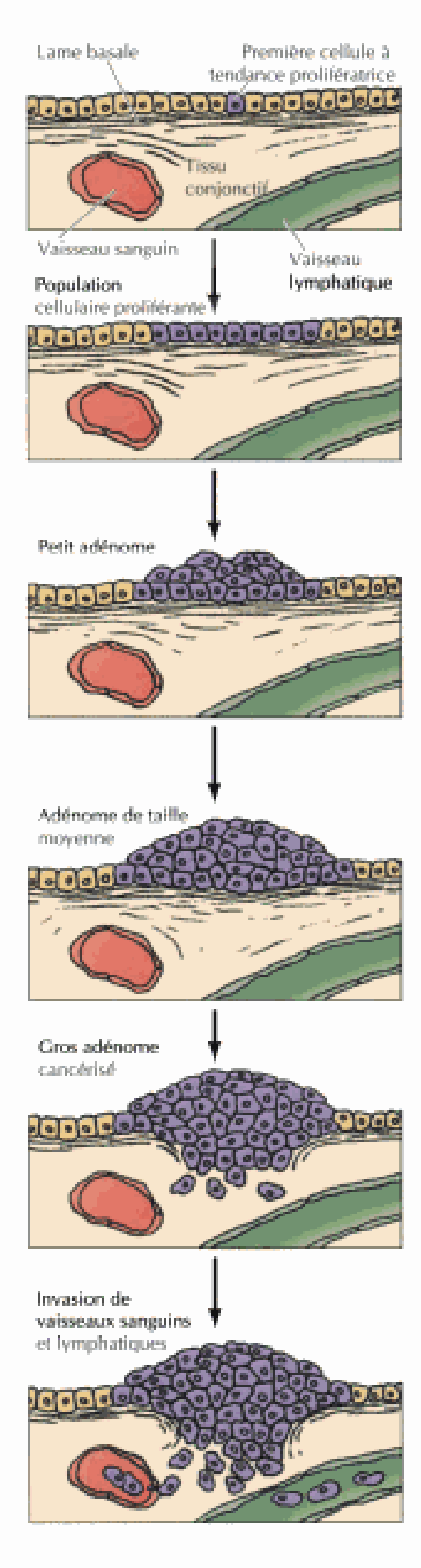
Raff, M. C., B. A. Barres, J. F. Burne, H. S. Coles, Y. Ishizaki and M. D. Jacobson. 1993. Programmed cell death and the control of cell survival: Lessons from the nervous system. *Science* 262: 695–700. [R]

Raff, M. 1998. Cell suicide for beginners. *Nature* **396** :119-122.[R]

Steller, H. 1995. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 267: 1445–1449. [R]

Vaux, D. L. and A. Strasser. 1996. The molecular biology of apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 2239–2244. [R]

Figure 15.5
Développement d'un carcinome du colon Au départ d'une unique cellule modifiée, apparaît une population de cellules proliférant rapidement, qui donne d'abord un adénome bénin de plus en plus volumineux, évoluant en un carcinome malin. Les cellules tumorales envahissent le tissu conjonctif sous-jacent, pénètrent dans les vaisseaux sanguins et lymphatiques, puis se disséminent dans tout l'organisme.

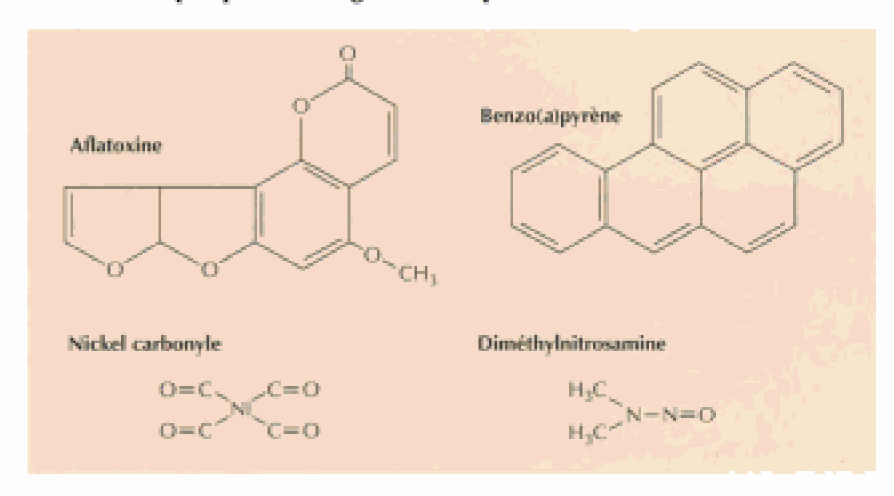


laire ; on les appelle **promoteurs tumoraux**, car la salve de prolifération cellulaire qu'ils induisent est essentielle à l'émergence de la population de cellules en prolifération accélérée qui va générer une tumeur ; un exemple classique de promoteur tumoral est la classe des esters de phorbol, qui stimulent la prolifération cellulaire en activant la protéine kinase C (voir figure 13.26). On a défini leur fonction en étudiant l'induction chimique de tumeurs cutanées chez la souris (figure 15.7). Dans ce système, il est possible de susciter la cancérogenèse par une seule application d'un cancérogène mutagène ; on ne voit pourtant pas apparaître de cancer cutané, sauf si on traite ensuite la souris par un promoteur tumoral (d'habitude un ester de phorbol) qui va accélérer la prolifération des cellules mutées.

Parmi les principaux promoteurs de tumeurs chez l'Homme, épinglons certaines hormones, notamment les œstrogènes. La prolifération des cellules de l'endomètre utérin, par exemple, est stimulée par les œstrogènes ; une concentration excessive d'œstrogènes dans le sang d'une femme rend celle-ci plus susceptible de souffrir d'une tumeur de l'endomètre. Le risque de voir apparaître ce type de cancer s'accroît donc significativement chez les femmes ménopausées soumises à un traitement de remplacement par œstrogènes seuls ; ce risque diminue fort heureusement quand on ajoute aux œstrogènes de la progestérone, qui contrecarre l'effet stimulant des œstrogènes sur la prolifération de l'endomètre.

Outre les agents chimiques et les rayonnements, il existe des virus qui induisent des cancers chez les animaux de laboratoire et chez l'Homme. Parmi les cancers humains dus à des virus, citons en premier lieu le cancer du foie et le cancer du col utérin, responsables de 10 à 20 % des cancers observés dans tous les pays. On s'intéresse à ces virus non seulement pour cette raison, mais aussi, comme on va le voir bientôt, parce que leur étude a grandement contribué à nous faire saisir les événements moléculaires qui se produisent entre le moment où une cellule entre en contact avec un cancérogène viral ou chimique et la cancérisation de cette cellule.

Figure 15.6
Structure de quelques cancérogènes classiques.



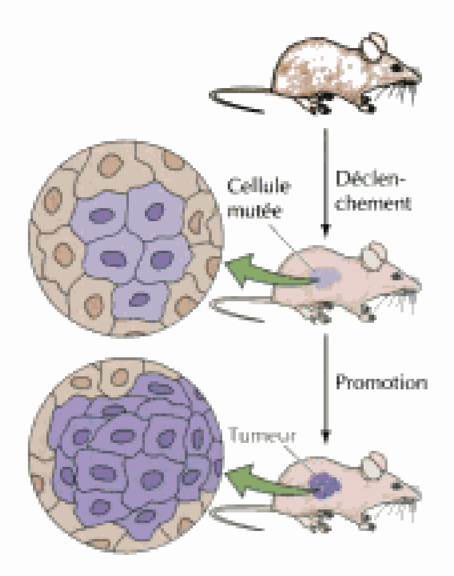


Figure 15.7
Induction de tumeur dans la peau d'une souris. Une tumeur est due à une mutation induite par un cancérogène. Son développement exige ensuite un contact avec un promoteur tumoral, capable de stimuler la prolifération de la cellule mutée.

Propriétés des cellules tumorales

La prolifération anarchique des cellules tumorales résulte d'une série de dérèglements frappant plusieurs mécanismes régulateurs dont nous avons parlé aux chapitres précédents ; cette relation de cause à effet apparaît sous divers traits phénotypiques qui distinguent une cellule tumorale de la cellule normale dont elle est issue. Toute cellule tumorale se reconnaît au dysfonctionnement des mécanismes qui régissent la prolifération, la différenciation et la durée de vie d'une cellule normale ; l'ensemble de ces traits particuliers aux cellules tumorales suffit à décrire l'état tumoral à l'échelle cellulaire.

Le caractère anarchique de la prolifération d'une cellule cancéreuse ne disparaît pas quand on met cette cellule en culture. La première différence observée en culture entre une cellule tumorale et une cellule normale est que la prolifération de la cellule normale subit une **inhibition de prolifération par contact** avec ses voisines (figure 15.8). En boîte de culture, une cellule normale se divise jusqu'à une densité déterminée, fixée en partie par la teneur du milieu de culture en facteurs de croissance (d'ordinaire sous forme de sérum ajouté au milieu de base) ; elle cesse alors de proliférer et se met au repos au stade G_0 du cycle cellulaire (voir figure 14.6). Par contre, la prolifération de la plupart des cellules tumorales n'obéit pas à l'inhibition de contact ; alors que les cellules normales répondent aux signaux d'arrêt de prolifération en se mettant au repos en phase G_0 du cycle, les cellules tumorales continuent de proliférer pour atteindre, en boîte de culture, des densités cellulaires aussi élevées que celles qu'on observe après leur prolifération anarchique *in vivo*.

Une autre différence qui distingue une cellule normale d'une cellule tumorale est que cette dernière a souvent une exigence réduite en facteurs de croissance extracellulaires. Comme on l'a montré au chapitre 13, la prolifération de la plupart des cellules dépend au moins en partie de la présence de facteurs de croissance polypeptidiques ; pour certains types cellulaires, le fibroblaste notamment, le pouvoir de proliférer en culture est principalement régi par la teneur du sérum en facteurs de croissance ; le besoin du fibroblaste en facteurs de croissance est en rapport direct avec le phénomène d'inhibition de contact, car la densité cellulaire à laquelle des fibroblastes normaux cessent de proliférer est proportionnelle au taux de facteurs de croissance atteint dans le milieu de culture.

Puisque les cellules tumorales exigent bien moins de facteurs de croissance que les cellules normales, on conçoit bien qu'elles prolifèrent de façon débridée tant *in vitro* que *in vivo*. Il arrive même qu'une cellule tumorale sécrète des facteurs de croissance qui stimulent sa propre prolifération

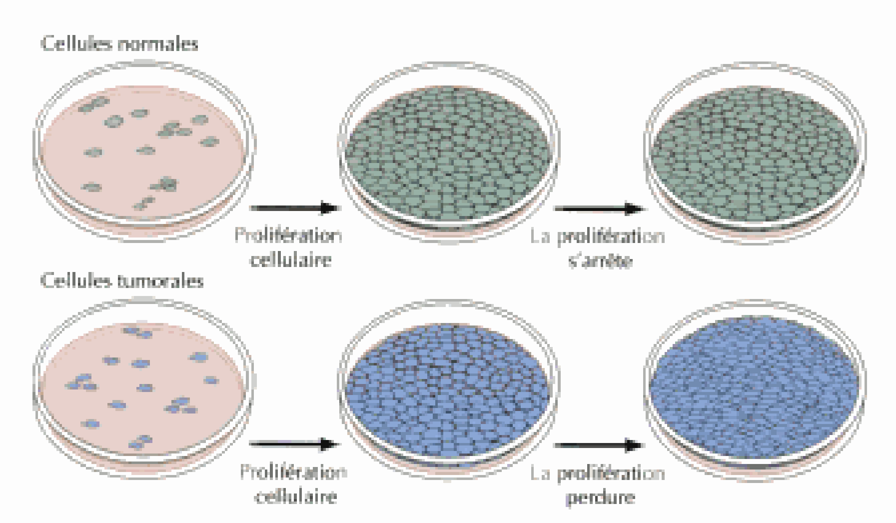


Figure 15.8
Inhibition par surpopulation. Les cellules normales prolifèrent en boîte de culture jusqu'à atteindre une densité donnée, puis se mettent au repos, mais les cellules tumorales continuent à proliférer quelle que soit la densité cellulaire de la culture.

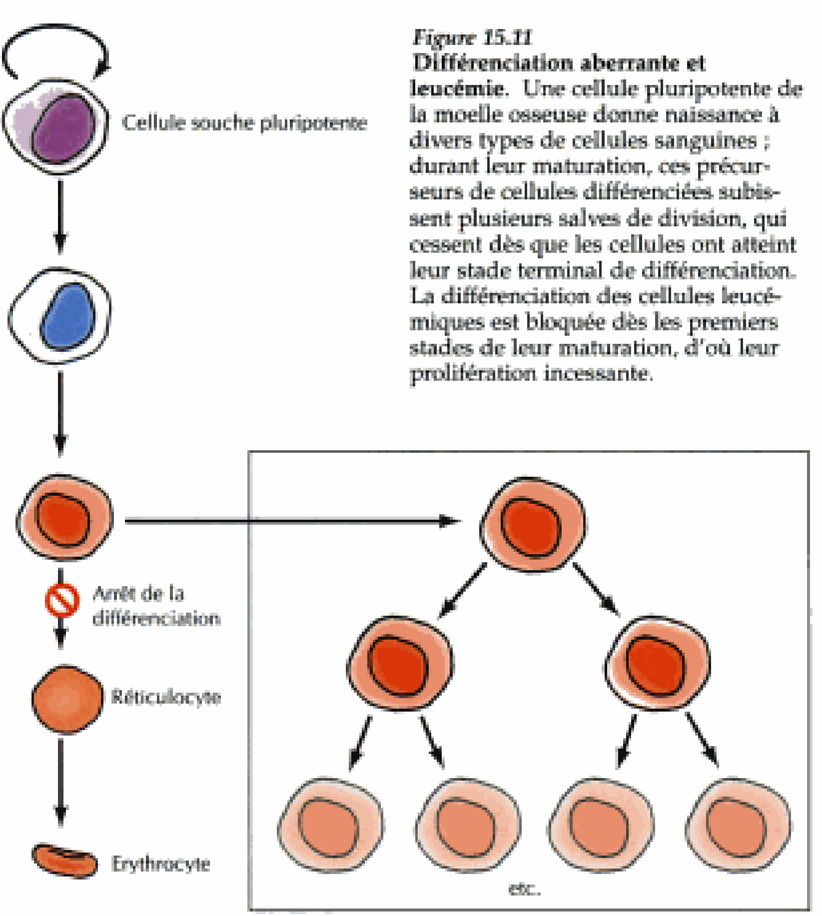


Figure 15.11
Différenciation aberrante et leucémie. Une cellule pluripotente de la moelle osseuse donne naissance à divers types de cellules sanguines ; durant leur maturation, ces précurseurs de cellules différenciées subissent plusieurs salves de division, qui cessent dès que les cellules ont atteint leur stade terminal de différenciation. La différenciation des cellules leucémiques est bloquée dès les premiers stades de leur maturation, d'où leur prolifération incessante.

elles cessent de se diviser. Par contre, les cellules leucémiques n'arrivent pas au bout de leur différenciation (figure 15.11) ; celle-ci s'interrompt à un stade précoce, en laissant à la cellule le pouvoir de se multiplier.

Comme on l'a montré au chapitre 14, la **mort cellulaire programmée** (ou **suicide cellulaire**) due à l'**apoptose** fait partie du programme de différenciation de beaucoup de types cellulaires, y compris les cellules sanguines. En même temps qu'elles échouent dans leur différenciation normale, beaucoup de cellules tumorales échappent à l'apoptose et vont survivre à leur consœurs normales. Cet échec du processus suicidaire favorise notablement le grossissement des tumeurs ; ainsi, la survie de nombreuses cellules normales dépend de signaux anti-apoptogènes issus des facteurs de croissance ou de la matrice extracellulaire, mais les cellules tumorales peuvent en général se passer de ces facteurs de croissance pour survivre. Le fait que les cellules tumorales n'entrent pas en apoptose quand elles sont privées des signaux extérieurs appropriés serait crucial non seulement lors du développement d'une tumeur primaire, mais aussi pour la survie et la prolifération ectopique des cellules métastatiques. Toute cellule normale subit aussi l'apoptose quand son ADN est endommagé, mais ce n'est pas le cas des cellules tumorales ; le fait que celles-ci échappent à l'apoptose accroît leur résistance à l'irradiation et aux médicaments cytostatiques, des agents qui endommagent l'ADN. Tant la survie des cellules anormales que leur prolifération jouent un rôle primordial dans la prolifération continue des cellules tumorales au sein d'un animal.

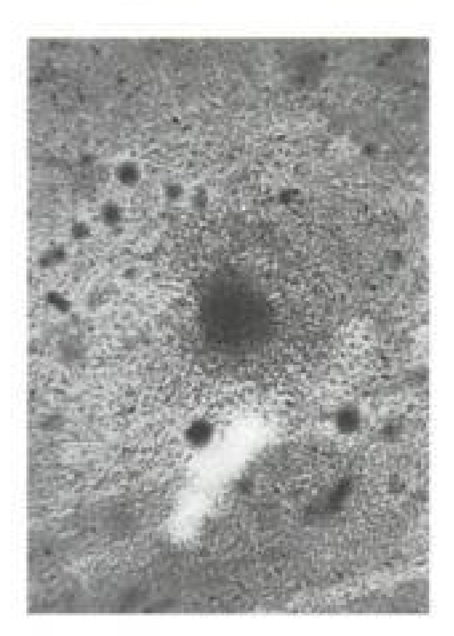


Figure 15.12
Recherche de foyer dans une culture de cellules. Foyer de fibroblastes d'embryon de poulet, induit par le virus du sarcome de Rous. (Gracieusement transmis par H. M. Temin et H. Rubin, 1958. *Virology* **6** :669).

Transformation de cellules en culture

Pour étudier l'induction tumorale par des rayonnements, des agents chimiques ou des virus, on a besoin de systèmes expérimentaux où l'on peut observer et mesurer l'influence d'un cancérogène donné. Bien qu'on puisse apprécier l'effet d'un cancérogène donné sur un animal d'expérience, ce genre d'expérience donne des résultats peu quantitatifs et peu fiables. La mise au point de tests *in vitro* pour déceler la transformation, en culture, d'une cellule normale en cellule tumorale (une **transformation cellulaire**) fut un grand progrès pour la cancérologie. Ces critères servent à déceler les cellules transformées, c'est-à-dire, parmi les cellules normales d'une culture mise en présence d'agents cancérogènes, celles qui se mettent à proliférer *in vitro* comme des cellules tumorales. Grâce à ces tests, l'étude expérimentale de la transformation cellulaire a atteint un niveau de raffinement qu'il est impossible d'atteindre par l'expérimentation animale.

Le premier critère mis au point, et le plus classique, pour évaluer la transformation d'une cellule est le test des foyers, mis au point par Howard Temin et Harry Rubin en 1958. Ce test se base sur le pouvoir qu'a l'observateur de reconnaître, au sein d'un tapis de cellules normales en culture, un ensemble de cellules transformées qu'on a appelé « foyer » (figure 15.12). La recherche des foyers s'appuie sur trois traits propres aux cellules transformées : morphologie altérée, perte de l'inhibition de la migration par contact et insensibilité de la prolifération à la densité cellulaire ; ces caractères font apparaître une colonie de cellules transformées, de morphologie anormale, qui débordent sur le tapis des cellules normales de la boîte de culture. Après une ou deux semaines de traitement par un agent cancérogène, on peut d'habitude observer et compter ce genre de foyers de cellules transformées ; en général, ces cellules transformées *in vitro* produiront une tumeur si on les inocule à des animaux sensibles, ce qui confirme que la transformation expérimentale *in vitro* est un critère fiable de cancérisation d'une cellule.

VIRUS TUMORIGÈNES

Des virus animaux (les **virus tumorigènes**) de six familles virales différentes sont capables de provoquer des cancers tant chez l'Homme que chez les animaux d'expérience (tableau 15.2). Les virus de cinq de ces familles possèdent un génome d'ADN et appartiennent à la famille des virus tumorigènes à ADN. Les membres de la sixième famille de virus tumorigènes possèdent un génome à ARN dans leurs virions, mais se répliquent *via* la synthèse d'un ADN proviral dans la cellule infectée. Parmi les virus responsables de cancers chez l'Homme, citons le virus de l'hépatite B (cancer du foie), le virus Epstein-Barr (lymphome de Burkitt et carcinome nasopharyngien) et le virus lymphotrope T humain (leucémie T de l'adulte). En

Table 15.2 Virus tumorigènes

Famille virale	Tumeurs humaines	Taille du génome (kb)
Virus tumorigènes à ADN		
Virus de l'hépatite B	Cancer du foie	3
SV40 et virus du polyome	Aucun	5
Virus de papillomes	Cancer du col	8
Adénovirus	Aucun	35
Virus de l'herpès	Lymphome de Burkitt, carcinome nasopharyngé	100-200
Virus tumorigènes à ARN		
Rétrovirus	Leucémie T chez l'adulte	9

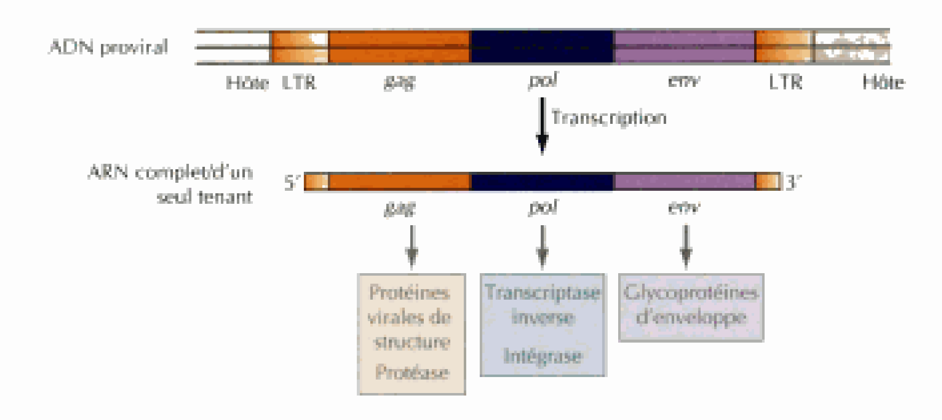


Figure 15.17
Structure du génome d'un rétrovirus typique. L'ADN proviral, intégré à l'ADN cellulaire, est transcrit en un ARN d'un seul tenant. Les molécules de ce transcrit primaire seront l'ARN génomique des nouvelles particules virales ainsi que l'ARNm des gènes *gag* et *pol*. De plus, la grande molécule d'ARN sera scindée pour donner l'ARNm de *env*. Le gène *gag* code la protéase virale et les protéines de structure du virion, le gène *pol* la transcriptase inverse et l'intégrase, le gène *env* les glycoprotéines d'enveloppe.

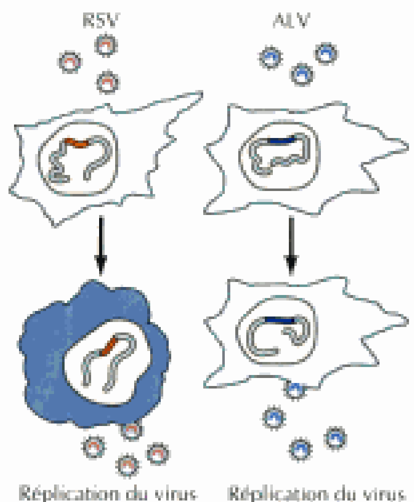
Les autres rétrovirus diffèrent assez bien les uns des autres par leur pouvoir oncogène. La plupart d'entre eux ne possèdent que trois gènes (*gag*, *pol* et *env*) indispensables à la réplication des virions, mais sans rapport avec la transformation (figure 15.17). Les rétrovirus de cette catégorie n'induisent que rarement des tumeurs, à la suite d'une intégration de l'ADN proviral dans certains gènes cellulaires ou dans leur voisinage.

Néanmoins, on connaît d'autres rétrovirus, pourvus de gènes induisant la transformation cellulaire, et qui sont de puissants cancérogènes. Le prototype de ces rétrovirus hautement oncogènes est le **virus du sarcome de Rous (RSV)**, découvert et isolé d'un sarcome de poulet par Peyton Rous en 1911. Après une éclipse de 50 années, l'étude de RSV a permis d'identifier le premier oncogène viral, modèle primordial pour saisir les divers aspects du développement tumoral à l'échelle moléculaire.

LES ONCOGÈNES

Le cancer est dû à des déficiences frappant les gènes clé régulateurs qui dirigent la prolifération, la différenciation et la survie des cellules. L'étude des virus tumorigènes a montré que certains de leurs gènes (baptisés **oncogènes**) ont le pouvoir d'induire la transformation de certaines cellules ; cela a ouvert aux biologistes les premières pistes d'une approche moléculaire des causes du cancer. Pourtant, pour la plupart (80 %), les cancers humains ne sont pas d'origine virale, mais sont dus, par exemple, à des rayonnements ou à des cancérogènes chimiques. Aussi, pour notre saisie du mécanisme de la cancérisation au sens large, fut-il primordial que l'étude des oncogènes viraux ait conduit à l'identification d'oncogènes cellulaires, impliqués dans les cancers d'origine non virale. La relation clé entre oncogène viral et oncogène cellulaire est due à l'étude des rétrovirus hautement oncogènes.

Figure 15.18
Transformation de cellule par RSV et ALV. Les virus RSV et ALV infectent tous deux les fibroblastes d'embryon de poulet et s'y répliquent, mais seul RSV produit des fibroblastes transformés.



Oncogènes de rétrovirus

Le premier oncogène viral décrit fut celui de RSV, qui transforme les fibroblastes de poulet mis en culture et induit de gros sarcomes dans les deux semaines suivant leur inoculation au poulet (figure 15.18) ; par contre, un virus proche, celui de la leucose aviaire (ALV) se reproduit dans les mêmes cellules que RSV sans y induire de transformation. Cette différence de potentiel transformant suggéra que RSV pouvait contenir une information génétique responsable de la transformation des cellules qu'il infecte. Cette hypothèse s'accorde avec la différence observée quand on compare la composition des génomes correspondants : l'ARN de RSV est long d'à peu près 10 kb, celui de ALV est un peu plus court, à savoir de 8,5 kb.

Au début des années '70, Peter Vogt et Steven Martin isolèrent des mutants par délétion et des mutants thermosensibles de RSV qui avaient

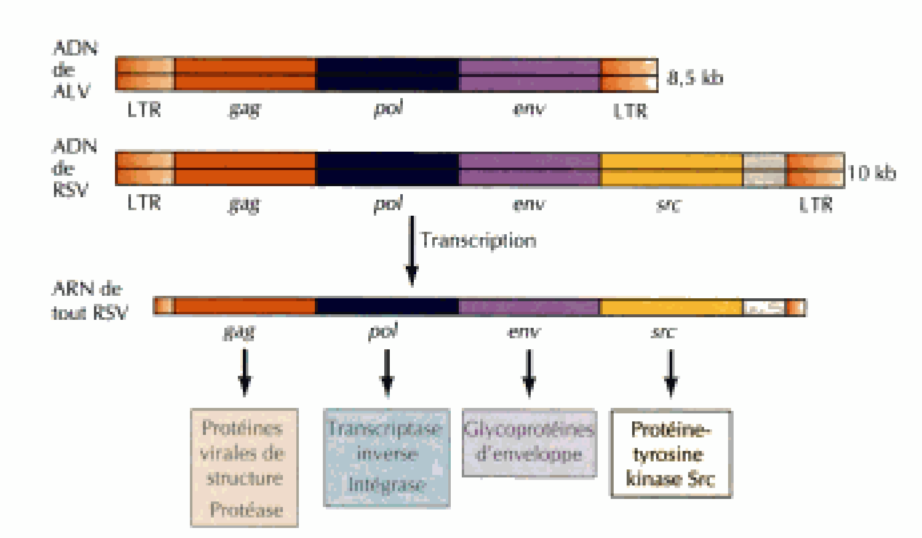


Figure 15.19
Contenu du génome de RSV. Le génome de RSV contient un gène supplémentaire, *src*, qui code la protéine Src, une protéine-tyrosine kinase.

perdu leur pouvoir transformant ; comme ces mutants, fait capital, continuaient de se répliquer normalement dans les cellules infectées, on devait admettre que RSV possède l'information génétique indispensable à la transformation des cellules, mais pas à la réplication des virions. L'étude plus approfondie de ces RSV montra que tant les mutants par délétion que les mutants thermosensibles révèlent l'existence d'un gène unique qui rend RSV capable de produire des tumeurs chez l'oiseau et de transformer ses fibroblastes en culture. Comme RSV provoque l'apparition de sarcomes, son oncogène reçut le nom de *src*. Le gène *src* a été ajouté au génome de RSV, car ALV s'en passe fort bien (figure 15.19) ; ce gène code une protéine de 60 kDa, qui fut la première protéine-tyrosine kinase identifiée (voyez Expérience clé, au chapitre 13).

D'une série d'animaux, dont le poulet, la dinde, la souris, le rat, le chat et le singe, on a isolé à ce jour plus d'une quarantaine de rétrovirus à haut potentiel oncogène ; tous possèdent, comme RSV, au moins un oncogène (parfois deux) qui est étranger à la réplication virale, mais indispensable à la transformation des cellules. Il arrive qu'on retrouve un même oncogène chez des virus différents, mais on a découvert plus d'une vingtaine d'oncogènes différents dans ce groupe de virus (tableau 15.3). Comme c'est le cas de *src*, bon nombre d'entre eux (comme *ras* et *raf*) codent une protéine qui s'est avérée être un élément important des messageries qui stimulent la prolifération cellulaire (voir figure 13.32).

Table 15.3 Oncogènes rétroviraux

Oncogène	Virus	Hôte
abl	Leucémie d'Abelson	Souris
akt	Virus AKT8	Souris
cbl	Cas NS-1	Souris
crk	Sarcome CT10	Poulet
erbA	Érythroblastose aviaire ES4	Poulet
erbB	Érythroblastose aviaire ES4	Poulet
ets	Érythroblastose aviaire E26	Poulet
fes	Sarcome félin Gardner-Arnstein	Chat
fgr	Sarcome félin Gardner-Rasheed	Chat
fms	Sarcome félin McDonough	Chat
fos	Sarcome ostéogène murin FBJ	Souris
fps	Sarcome de Fujinami	Poulet
jun	Sarcome aviaire 17	Poulet
kit	Sarcome félin Hardy-Zuckerman	Chat
maf	Sarcome aviaire AS42	Poulet
mos	Sarcome de Moloney	Souris
mpl	Leucémie myéloïde	Souris
myb	Myéloblastose aviaire	Poulet
myc	Myélocytomatose aviaire	Poulet
qin	Sarcome aviaire 31	Poulet
raf	Sarcome murin 3611	Souris
rasH	Sarcome de Harvey	Rat
rasK	Sarcome de Kirsten	Rat
rel	Réticuloendothéliose	Dinde
ros	Sarcome UR2	Poulet
sea	Érythroblastose aviaire S13	Poulet
sis	Sarcome simien	Singe
ski	SK aviaire	Poulet
src	Sarcome de Rous	Poulet
yes	Sarcome Y73	Poulet

Proto-oncogènes

Un trait inattendu des oncogènes de rétrovirus est qu'ils n'interviennent pas dans la réplication virale ; il est en effet paradoxal de trouver un oncogène viral qui n'a rien à voir avec le cycle viral dans des virus pour la plupart taillés de façon à se répliquer de

EXPÉRIENCE CLÉ



Découverte des proto-oncogènes

DNA Related to the Transforming Gene(s) of Avian Sarcoma Viruses Is Present in Normal Avian DNA

Dominique Stehelin, Harold E. Varmus, J. Michael Bishop and Peter K. Vogt

Department of Microbiology, University of California, San Francisco (DS, HEV, and JMB) and Department of Microbiology, University of California, Los Angeles (PKV)

Nature, Volume 260, 1976, pages 170–175

Contexte

L'analyse génétique de RSV permit de caractériser le premier oncogène viral (*src*) comme un gène indispensable à la transformation d'une cellule, mais inutile dans la réplication du virus. Le fait de trouver un virus à pouvoir hautement oncogène dans la tumeur apparue chez un animal infecté suggéra aux chercheurs l'hypothèse que les oncogènes des rétrovirus proviennent d'un gène apparenté présent dans les cellules de l'hôte. En accord avec cette idée, l'hybridation d'acides nucléiques avec des noyaux de cellules normales y mit en évidence des séquences d'ADN apparentées à des rétrovirus ; il était cependant difficile de savoir si ces séquences ressemblaient à celles des oncogènes rétroviraux ou à celles des gènes employés à la réplication virale.

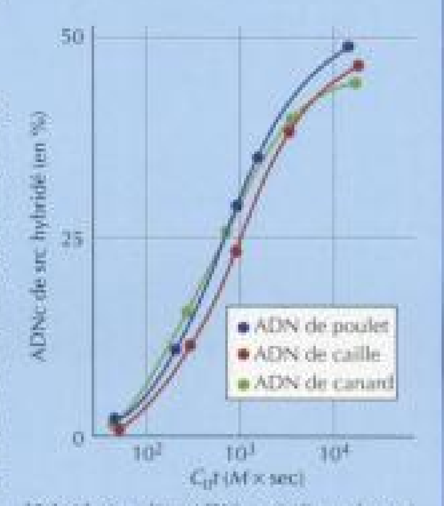
L'équipe de H. Varmus et M. Bishop résolut cette question cruciale en profitant des caractéristiques génétiques de l'oncogène *src* ; P. Vogt avait déjà isolé des mutants de RSV, défectifs dans le test de transformation cellulaire, qui portaient des délétions d'environ 1,5 kb correspondant à la majeure partie du gène *src*. Stehelin et ses collègues utilisèrent ces mutants pour produire une sonde d'ADNc qui correspondait exactement avec la séquence de *src* ; par hybridation à l'ADN de cellules normales, ils démontrèrent que celles-ci contenaient des séquences d'ADN apparentées à celles de *src*.

Preuve expérimentale

À l'aide de la transcriptase inverse, ils commencèrent par synthétiser des sondes radioactives d'ADNc composées de courts fragments d'ADN monocaténaires complémentaires de la totalité de l'ARN génomique de RSV. On hybrida alors ces sondes à un excès d'ARN extrait d'un mutant de délétion défectif pour la transformation cellulaire ; les fragments d'ADNc complémentaires aux gènes de réplication virale s'hybridèrent à l'ARN du RSV défectif pour la transformation, en donnant des duplexes ARN-ADN ; par contre, les fragments d'ADNc complémentaires à *src* ne trouvaient pas leur complément dans l'extrait et restaient monocaténaires. Les expérimentateurs isolèrent ensuite cet ADN monocaténaire pour s'en servir comme sonde spécifique des séquences de l'oncogène *src*. Comme le laissait prévoir la taille des délétions observées chez les mutants RSV défectifs pour la transformation, la sonde propre à *src* couvrait environ 1,5 kb de l'ARN de RSV.

L'ADNc radioactif de *src* servit ensuite de sonde pour trouver par hybridation des séquences d'ADN apparentées dans les cellules normales de poulet.

Ce fut une surprise de voir que l'ADNc de *src* s'hybridait très bien à l'ADN de poulet normal, ainsi qu'à l'ADN d'autres espèces aviaires (voir la figure). Ces expériences démontraient que la cellule normale contient



Hybridation d'un ADNc spécifique de *src* à de l'ADN normal de poulet, de caille et de canard. (voir figure 4.6).

façon optimale. Aussi les virologues se demandèrent-ils d'où venaient les oncogènes rétroviraux et par quelle voie ils s'étaient intégrés au génome viral ; cette quête aboutit à l'identification d'oncogènes cellulaires dans les cancers humains.

La première piste menant à l'origine des oncogènes fut la façon dont on s'y prit pour isoler des rétrovirus oncogènes (figure 15.20). Après avoir inoculé à un lot de 150 souris des virus non transformants pourvus seulement des gènes *gag*, *pol* et *env* nécessaires à la réplication virale, on s'aperçut qu'une des souris portait un lymphome ; de cette tumeur, on isola ensuite

Protéine proto-oncogène Raf



Protéine oncogène Raf



Figure 15.21
Protéine oncogène RAF. La protéine Raf du proto-oncogène *raf* comporte un domaine amino-terminal régulateur et un domaine C-terminal possédant une activité de protéine kinase. Dans la protéine oncogène virale Raf, le domaine régulateur a été éliminé au profit de séquences virales Gag ; c'est pourquoi le domaine kinasique de Raf possède une activité constitutive, responsable de son activité transformante.

signalisation qui gouvernent la prolifération normale de la cellule (par exemple, *src*, *ras* et *raf*) ; les oncogènes sont des formes modifiées dans leur expression, ou des formes mutées, du proto-oncogène correspondant. À cause de ces modifications, les oncogènes provoquent une prolifération cellulaire anarchique et l'apparition de cancers.

Tel qu'on le trouve dans un génome de rétrovirus, un oncogène se distingue du proto-oncogène correspondant par plusieurs traits. D'une part, l'oncogène viral est transcrit à partir du promoteur et des séquences amplificatrices virales et n'est pas commandé par les séquences régissant habituellement la transcription du proto-oncogène ; aussi l'oncogène s'exprime-t-il plus intensément que le proto-oncogène et est-il parfois transcrit dans des types cellulaires inhabituels. Ces aberrations de la transcription génique suffisent dans certains cas à transformer un proto-oncogène de fonction normale en un oncogène capable de transformer une cellule.

D'autre part, outre ces modifications de l'expression génique, les oncogènes codent souvent chacun une protéine dont la structure et la fonction diffèrent de celles de la protéine codée par leur homologue normal. Maints oncogènes, comme *raf*, s'expriment sous forme de protéine hybride, comportant à son bout aminé des séquences d'origine virales (figure 15.21). Les recombinaisons qui génèrent ces protéines hybrides ont souvent lieu au moment de la capture du proto-oncogène par le rétrovirus, et des séquences tant du bout aminé que du bout carboxyle du proto-oncogène sont souvent éliminées au cours de ce processus ; il arrive que cet élagage entraîne la perte du domaine de régulation qui régit l'activité de la protéine codée par le proto-oncogène et, ce faisant, fait produire à la cellule une protéine oncogène dont le fonctionnement échappe à tout contrôle. L'oncogène viral *raf*, par exemple, code une protéine hybride dont le bout aminé a perdu les séquences du gène *raf* normal ; ces séquences N-terminales sont essentielles à la régulation normale de l'activité protéine kinasique de Raf ; en leur absence, la protéine Raf codée par l'oncogène s'exprime de façon constitutive, non modulée, et finit par faire proliférer la cellule de façon anarchique, la transformant en une cellule tumorale.

Les oncogènes diffèrent souvent du proto-oncogène correspondant par des mutations ponctuelles résultant en substitutions d'un acide aminé par un autre dans la séquence de la protéine ; comme les délétions décrites ci-dessus, certaines de ces substitutions entraînent une dérégulation de la protéine oncogène ; c'est le cas des protéines des oncogènes *ras* dont nous allons décrire le rôle dans les cancers chez l'Homme.

Oncogènes trouvés dans les tumeurs humaines

En cherchant l'origine des oncogènes rétroviraux, les biologistes en vinrent à se demander si les tumeurs sans cause virale apparente contenaient des oncogènes issus de proto-oncogènes par mutation ou par réarrangement d'ADN au cours de la progression tumorale. L'implication d'oncogènes cellulaires dans des tumeurs humaines fut prouvée pour la première fois de façon directe lors d'expériences de transfert de gène effectuées par les groupes de Robert Weinberg et de l'auteur de ce traité en 1981. Ils montrèrent que de l'ADN extrait d'un carcinome humain de la vessie provoquait avec une bonne efficacité la transformation de cellules murines receveuses cultivées *in vitro* ; ceci montrait que la tumeur humaine contenait un oncogène cellulaire biologiquement compétent (figure 15.22). Le transfert de gène

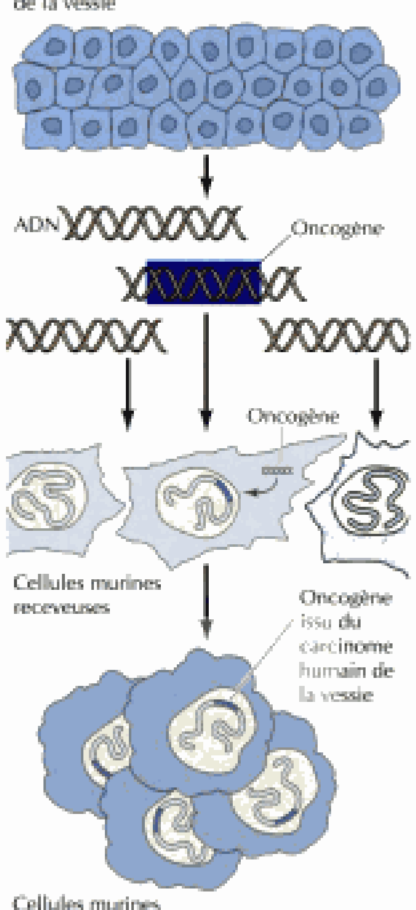


Figure 15.22
Détection d'oncogène dans une tumeur humaine par transfert de gène. L'ADN extrait d'un carcinome humain de la vessie produit une transformation dans des cellules murines receveuses entretenues en culture. Cela est dû à l'intégration et à l'expression d'un oncogène hérité de la tumeur humaine.

mutations qui transforment un proto-oncogène *ras* en oncogène sont dues à des cancérogènes chimiques ; ceci établit un lien direct entre l'effet mutagène des cancérogènes et leur pouvoir de transformer des cellules.

Comme nous l'avons dit au chapitre 13, les gènes *ras* codent des protéines fixant les nucléotides guanyliques, protéines mises en jeu dans la transduction de signaux mitogènes émis par divers récepteurs de facteurs de croissance. L'activité des protéines Ras est régie par leur séquestration de GTP et de GDP, puisqu'elles passent d'une forme active (chargée de GTP) à une forme inerte (chargée de GDP) (voir figure 13.33). Les mutations découvertes dans les oncogènes *ras* ont ceci de particulier qu'elles contraignent les protéines Ras à rester dans la conformation active (chargée de GTP) en permanence ; ceci résulte en majeure partie de ce que ces protéines oncogènes Ras ne répondent plus à la protéine qui active la fonction GTPase (GAP), c'est-à-dire celle qui stimulerait l'hydrolyse du GTP fixé à une protéine Ras normale ; à cause de cette réduction de leur activité GTPase intracellulaire, les protéines oncogènes Ras restent actives parce que chargées de GTP, et font proliférer les cellules.

Il est d'autres moyens que des mutations ponctuelles pour transformer un proto-oncogène en l'un des oncogènes qu'on isole d'une tumeur humaine ; beaucoup d'entre ces tumeurs portent des anomalies dans la structure d'un chromosome, par exemple des translocations, des duplications et des délétions. Tout réarrangement de gène causé par une translocation chromosomique génère souvent un oncogène ; dans certains cas, l'étude de tel réarrangement a mis en évidence un oncogène déjà impliqué dans l'origine d'un cancer ; dans d'autres cas, le clonage moléculaire et l'analyse des séquences d'ADN remaniées du clone ont mis au jour un nouvel oncogène.

Le premier cas décrit d'activation d'un oncogène par translocation chromosomique fut celui de l'oncogène **c-*myc*** dans le lymphome de Burkitt humain et le plasmacytome de souris, deux tumeurs des lymphocytes B producteurs d'anticorps (figure 15.24). Les deux sortes de tumeurs se caractérisent par des translocations chromosomiques frappant les gènes qui codent

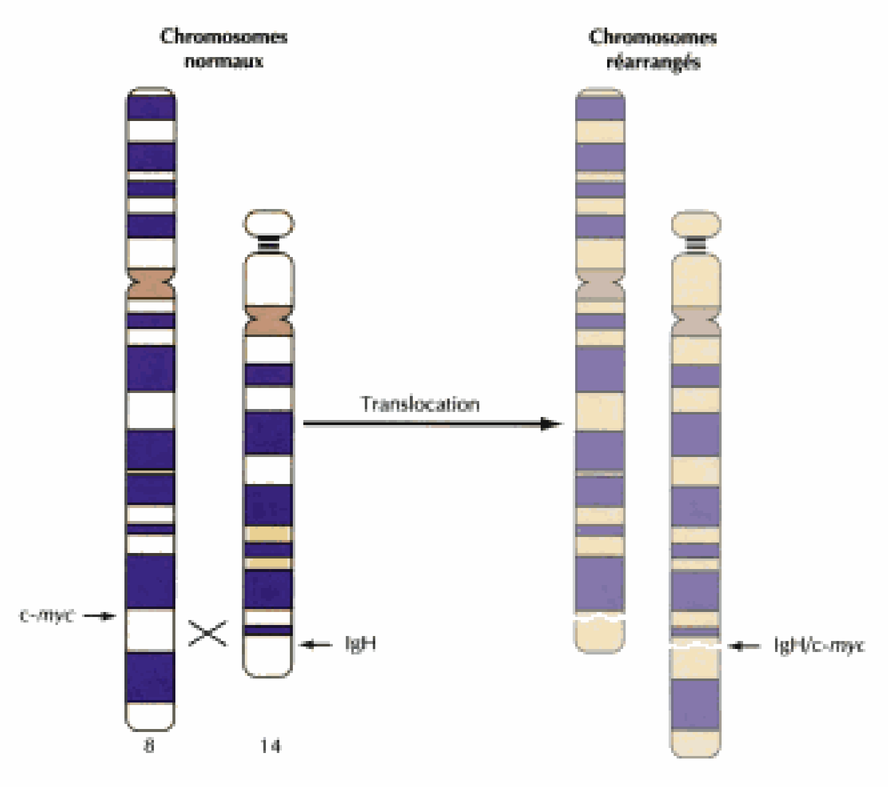


Figure 15.24
Translocation de c-*myc*. Dans le lymphome de Burkitt, le proto-oncogène c-*myc* a passé du chromosome 8 au locus de la chaîne lourde d'immunoglobuline (IgH) porté par le chromosome 14 ; cela rend compte de l'expression anarchique de c-*myc*.

tains types cellulaires, certains oncogènes proviennent de gènes codant une protéine G ; l'oncogène *gsp*, qui code le protomère α de G_s, est issu de mutations ponctuelles semblables à celles qui frappent *ras* ; ces mutations font s'exprimer le protomère α de G_S selon le mode constitutif, stimulant de façon systématique l'activité de l'adénylyl cyclase. Comme on peut s'y attendre, l'oncogène *gsp* est actif dans les tumeurs de la thyroïde et de l'hypophyse, là où l'AMPc stimule la prolifération cellulaire. D'autres mutations de même type transforment en oncogènes des gènes codant les protomères α d'autres protéines G, notamment dans les tumeurs de la surrénale et de l'ovaire.

Les messageries intracellulaires sensibles aux facteurs de croissance régissent en bout de course les éléments de la machinerie du cycle cellulaire qui poussent le cycle au delà du point de restriction G_1. La stimulation par les facteurs de croissance font s'exprimer les cyclines de type D, qui sont essentielles au couplage de la réponse mitogène avec l'avancement du cycle (voir figure 14.18). On doit donc s'attendre à ce que le gène codant la cycline D1 soit un proto-oncogène, activé en oncogène (***PRAD*1**) à sa suite d'une translocation chromosomique ou d'une amplification génique. Ces anomalies rendent constitutive l'expression de la cycline D1, qui fait alors proliférer les cellules en l'absence de tout facteur de croissance habituel.

Si la plupart des oncogènes stimulent la prolifération cellulaire, le pouvoir oncogène de certains facteurs de transcription est dû plutôt à l'inhibition de la différenciation cellulaire. On a mentionné au chapitre 13 que l'hormone thyroïdienne et l'acide rétinoïque poussaient divers types de cellules à se différencier. Ces hormones diffusent à travers la membrane plasmique pour atteindre des récepteurs intracellulaires qui servent de régulateurs protéiques de la transcription. Les formes mutées, tant du récepteur d'hormone thyroïde (**ErbA**) que du récepteur d'acide rétinoïque (**PML/RARα**) sont les oncogènes protéiques présents respectivement dans la leucémie érythroïde du poulet et dans la leucémie promyélocytaire aiguë humaine. Dans les deux cas, il semble que le récepteur devenu oncogène par mutation concurrence son homologue normal ; ce faisant, il bloque la différenciation cellulaire et maintient les cellules leucémiques dans un état de prolifération désordonnée (figure 15.30). Dans le cas de la leucémie promyélocytaire aiguë, l'administration de hautes doses d'acide rétinoïque arrive à contrebalancer l'influence de la protéine oncogène PML/RARα et à enclencher la différenciation des cellules. Cette constatation des expérimentateurs est exploitée par les cliniciens : chez les patients souffrant de leucémie promyélocytaire aiguë, l'acide rétinoïque rétablit la différenciation et empêche la prolifération anarchique des myélocytes.

Comme nous l'avons expliqué au début de ce chapitre, une facette importante de la malignité d'une tumeur réside dans le fait que certaines cellules échappent au phénomène de suicide cellulaire, ou apoptose. Ainsi, on pense que l'oncogène ***bcl*-2** intervient dans l'apparition des lymphomes parce qu'il contrecarre l'apoptose et non parce qu'il pousse les cellules à proliférer. L'oncogène *bcl*-2 provient d'une translocation chromosomique qui accélère l'expression du gène *bcl*-2 ; ceci empêche l'apoptose et fait survivre les cellules dans des conditions qui mènent habituellement au suicide cellulaire, par exemple une pénurie de facteurs de croissance. Si on ignore par quelle voie agit Bcl-2, le rôle oncogène de *bcl*-2 souligne de façon frappante la place maîtresse que le suicide cellulaire programmé joue dans la cancérisation maligne.

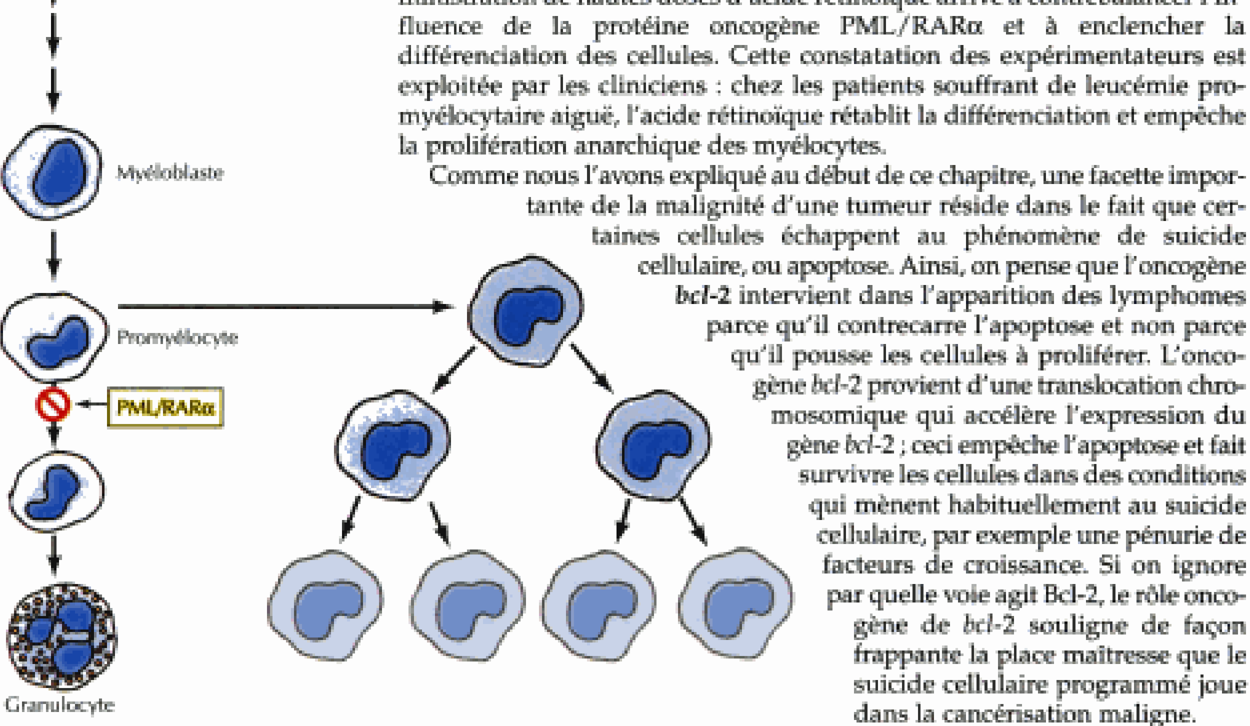


Figure 15.30
Rôle de la protéine oncogène PML/RARα. La protéine composite PML/RARα empêche les promyélocytes de se différencier en granulocytes.

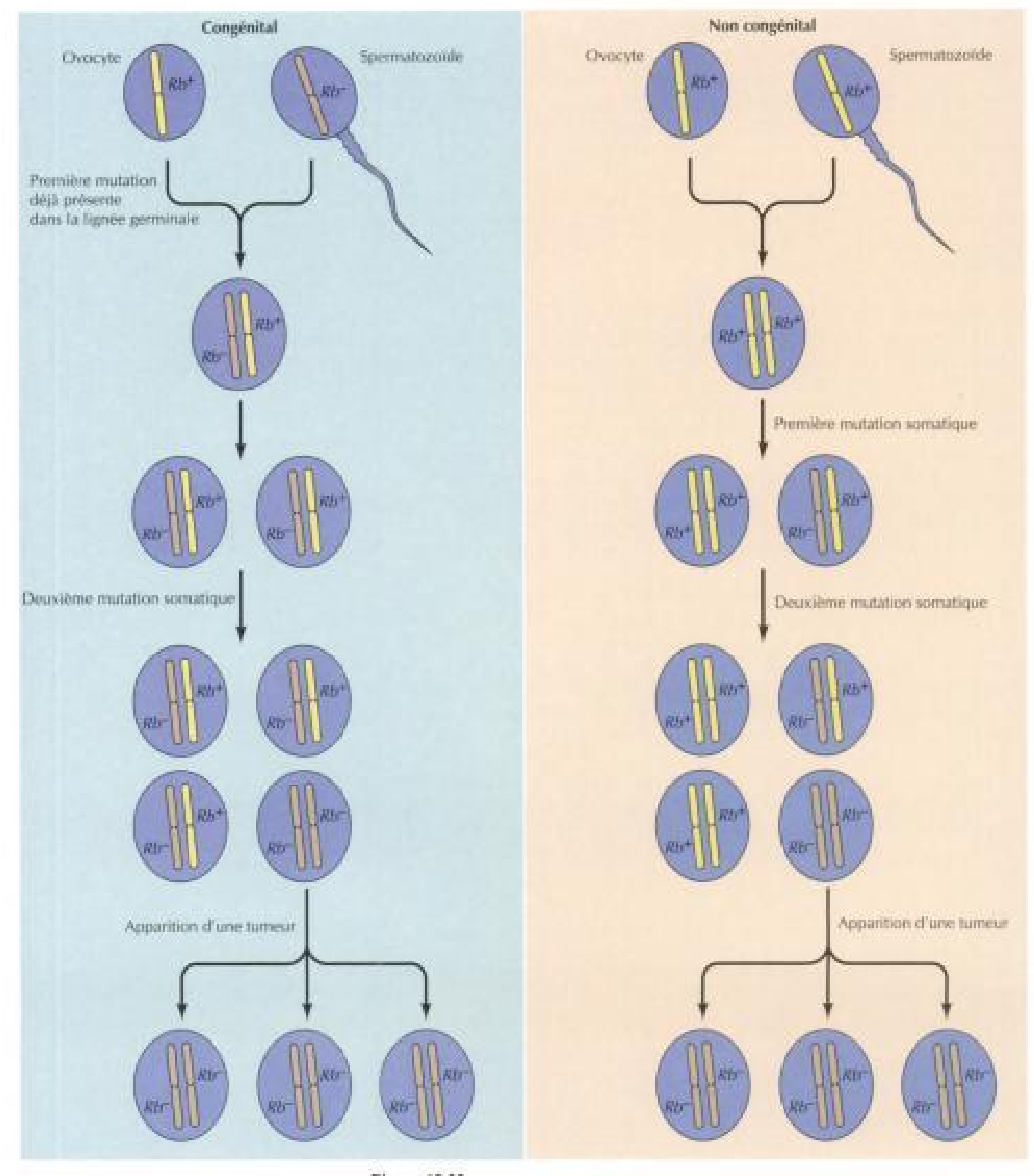


Figure 15.33
Mutation du gène *Rb* dans la genèse d'un rétinoblastome. Dans un rétinoblastome congénital, un exemplaire défectif du gène *Rb* (*Rb*$^-$) est transmis par l'ascendant porteur. Une mutation supplémentaire, somatique, qui frappe l'unique exemplaire normal de gène *Rb*$^+$ que possède encore la cellule rétinienne va provoquer l'apparition d'un rétinoblastome. Dans les cas de rétinoblastomes non congénitaux, l'individu hérite de deux gènes *Rb* $^+$, normaux, et ne souffrira de rétinoblastome que si des mutations somatiques frappent les deux exemplaires *Rb* d'une même cellule.

ser ; à cette susceptibilité doit donc se superposer d'autres événements avant qu'une tumeur apparaisse. En 1971, Alfred Knudson émit l'idée que l'apparition d'un rétinoblastome dépend de deux mutations, celles qui se sont avérées ensuite correspondre à la perte des deux exemplaires fonctionnels du gène de susceptibilité tumorale (le gène ***Rb*** suppresseur de tumeur) dont sont pourvus les deux chromosomes homologues d'une cellule diploïde normale (figure 15.33). L'individu menacé d'un rétinoblastome congénital porte dans ses cellules un exemplaire défectueux du gène *Rb* ; l'invalidation de ce seul exemplaire du gène ne suffit pas à générer la tumeur, mais on voit bientôt apparaître un rétinoblastome chez presque tous ces porteurs, à la suite d'une autre mutation, somatique, qui fait perdre l'usage de l'autre allèle *Rb*. Il est exceptionnel de voir apparaître un rétinoblastome non congénital, car il serait dû alors à deux mutations somatiques indépendantes invalidant les deux exemplaires *Rb* d'une même cellule.

La nature inhibitrice de l'influence régulatrice du gène *Rb* sur la cancérogenèse fut d'abord le résultat d'observations touchant la morphologie des chromosomes ; certaines tumeurs montraient des délétions de la région 13q14, suggérant que c'était la perte (et non l'activation) du gène *Rb* qui était responsable de la cancérisation (figure 15.34). En étudiant la carte du gène, on s'aperçut ensuite que l'apparition de la tumeur coïncidait avec la perte des deux allèles *Rb* normaux par les cellules tumorales, ce qui renforçait la thèse selon laquelle *Rb* servait à éviter la cancérisation. En isolant le gène *Rb* sous forme de clone moléculaire en 1986, on put démontrer que *Rb* était perdu ou muté dans tous les rétinoblastomes examinés. Les expériences de transfert de gène montrèrent enfin que l'acquisition d'un gène *Rb* normal par une cellule de rétinoblastome fait disparaître son potentiel tumorigène, prouvant ainsi de façon directe que *Rb* agit comme un suppresseur de tumeur.

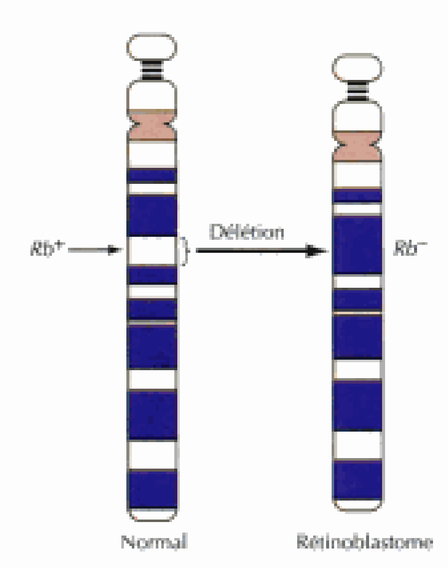
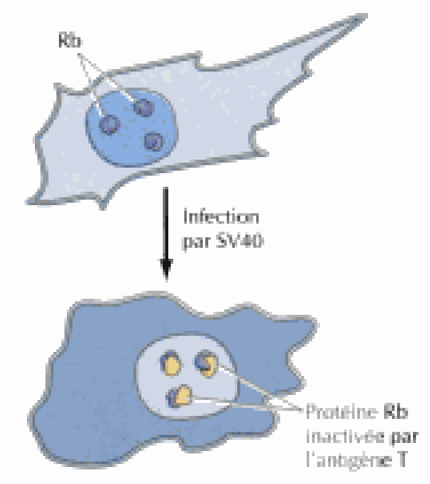


Figure 15.34
Délétion de *Rb* dans un rétinoblastome. Dans beaucoup de rétinoblastomes, on observe une délétion du locus chromosomique 13q14 qui porte le gène *Rb*.

Quoique le gène *Rb* fût découvert dans une tumeur humaine très rare, il intervient aussi dans certains types assez courants de tumeurs de l'adulte ; grâce au gène *Rb* cloné, on a établi que ce gène est perdu ou invalidé dans maints cancers de la vessie, du sein et du poumon. La déficience du gène suppresseur de tumeur *Rb* n'est donc pas limitée au rétinoblastome, mais on la retrouve dans une proportion notable des cancers les plus communs chez l'Homme. En outre, comme on l'a mentionné au début de ce chapitre, la protéine Rb est la cible préférée des protéines oncogènes d'un certain nombre de virus tumorigènes à ADN, dont SV40, les adénovirus et les papillomavirus humains, qui s'attachent à Rb et l'empêchent d'agir (figure 15.35). Quand ces virus deviennent transformants, ce n'est pas par inactivation mutationnelle du gène *Rb*, mais en partie au moins en interférant avec la fonction de la protéine Rb.

Figure 15.35
Interaction de Rb avec les protéines oncogènes des virus tumorigènes à ADN. Les protéines oncogènes de divers virus oncogènes à ADN (comme l'antigène T de SV40) doivent leur pouvoir transformant à ce qu'elles s'attachent à Rb et l'inactivent.



Les études qui démontrèrent l'activité antitumorale de *Rb* servirent de prototype à l'identification d'autres gènes suppresseurs de tumeur dont l'invalidation concourt à l'apparition de diverses tumeurs humaines (tableau 15.5). Certains de ces gènes étaient responsables de rares cancers congénitaux, y jouant le même rôle que *Rb* dans les rétinoblastomes congénitaux ; d'autres gènes suppresseurs de tumeur étaient des gènes souvent perdus ou mutés, découverts dans des tumeurs non congénitales courantes, comme le carcinome du colon. Dans chaque cas, on remarqua que la plupart des gènes suppresseurs de tumeur sont en jeu dans divers cancers, qu'ils soient ou non de nature congénitale ; les mutations de quelques-uns d'entre eux sont en effet les anomalies les plus courantes auxquelles on doit l'apparition des tumeurs humaines.

L'autre gène suppresseur de tumeur à présent bien étudié est *p53*, qu'on trouve très souvent inactivé dans toutes sortes de tumeurs humaines, comme les leucémies, les lymphomes, les sarcomes, les tumeurs cérébrales ainsi que dans de nombreux carcinomes, du sein, du colon et du poumon. Les mutations de *p53* interviendraient dans près de 50 % de tous les cancers chez

Table 15.5 Gènes suppresseurs de tumeur

Gène	Type de cancer
APC	Carcinome colorectal
BRCA1	Carcinomes du sein et de l'ovaire
BRCA2	Carcinome du sein
DCC	Carcinome colorectal
DPC4	Carcinome du pancréas
INK4	Mélanome, cancer du poumon, tumeur du cerveau leucémies, lymphomes
NF1	Neurofibrosarcome
NF2	Méningiome
p53	Tumeurs cérébrale, colorectale, de l'œsophage, du foie et du poumon ; sarcomes ; leucémies et lymphomes
Rb	Rétinoblastome ; sarcomes ; carcinomes de la vessie, du sein, du poumon
VHL	Carcinome de l'épithélium rénal
WT1	Tumeur de Wilm

l'Homme, faisant de *p53* la cible la plus touchée des génomes des cellules cancéreuses étudiées. Remarquons ici qu'on attribue à des mutations héréditaires de *p53* la transmission d'un syndrome cancéreux congénital rare, où des cancers de toutes sortes apparaissent chez les patients. En outre, la protéine p53, est, comme Rb, la cible des protéines oncogènes de SV40, des adénovirus et des papillomavirus humains.

Comme *p53*, le gène suppresseur de tumeur ***INK4*** est en jeu dans plusieurs cancers courants, notamment dans celui du poumon. Dans le cancer du colon, deux autres gènes suppresseurs de tumeur (***APC*** *et* ***DCC***) sont fréquemment amputés ou mutés ; si elles interviennent dans la forme non congénitale de ce cancer très courant, les mutations du gène *APC* causent aussi une forme congénitale rare de cancer du colon appelée polypose adénomateuse familiale ; on voit apparaître chez ces patients des centaines de petits adénomes coliques bénins (polypes), dont certains deviendront inévitablement malins.

On accuse d'autres gènes suppresseurs de tumeur d'être responsables de carcinomes du sein, de l'ovaire, du pancréas, ainsi que de plusieurs autres syndromes cancéreux congénitaux rarement observés, comme la tumeur de Wilm. La liste des gènes suppresseurs de tumeur s'allonge continuellement et leur identification est l'une des branches les plus actives de la recherche en cancérologie.

Rôle des produits des gènes suppresseurs de tumeur

Contrairement aux protéines codées par les oncogènes et les proto-oncogènes, les protéines codées par la plupart des gènes suppresseurs de tumeur freinent la prolifération cellulaire. Aussi, l'inactivation de ces gènes suppresseurs induit-elle l'apparition de tumeurs, puisqu'elle met hors jeu des modulateurs de nature inhibitrice. On connaît des cas où une protéine suppresseur de tumeur s'interpose sur la voie régulatrice même qui est stimulée par le produit de tel ou tel oncogène.

La protéine codée par le gène suppresseur de tumeur ***NF1*** est un exemple intéressant d'antagonisme entre le produit d'un oncogène et celui d'un gène suppresseur de tumeur. La protéine NF1 tempère l'activité des protéines proto-oncogènes Ras, car elle accroît leur capacité de GTPase (voir figure 13.33) ; c'est pourquoi on trouve des taux élevés de la forme active de Ras, chargée de GTP, dans les cellules tumorales où *NF1* est invalidé ; cette invalidation stimulerait la prolifération cellulaire *via* une dérégulation de la messagerie utilisant Ras.

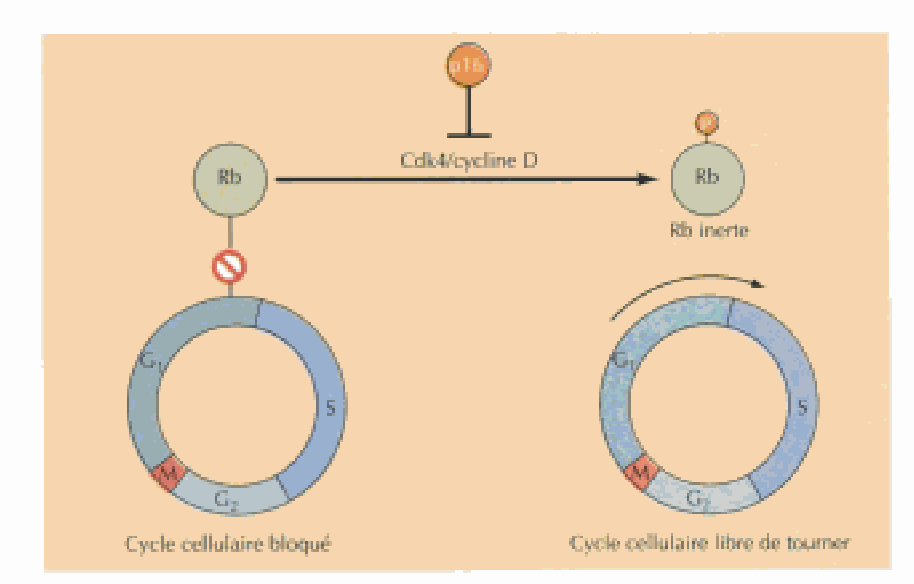


Figure 15.36
Inhibition de l'avancement du cycle cellulaire par Rb et p16. Rb empêche le cycle de tourner au delà du point de restriction G_1 ; en inhibant Rb par phosphorylation, les complexes Cdk4/cycline-D provoquent le franchissement du point de restriction. L'activité d'un complexe Cdk4/cycline-D est contrecarrée par p16.

Plusieurs gènes suppresseur de tumeur codent des protéines qui sont des modulateurs de transcription. Cet le cas du produit de ***WT1***, souvent devenu inerte dans les tumeurs de Wilm (tumeur rénale de l'enfance). La protéine WT1 est un répresseur connu pour s'opposer à la transcription de certains gènes sensibles aux facteurs de croissance ; l'un de ces gènes serait celui qui code le facteur de croissance insulinomimétique II, surexprimé dans les tumeurs de Wilm, et dont le potentiel tumorigène serait dû au fait qu'il stimule la cellule de façon autocrine. L'invalidation de WT1 ferait donc s'exprimer le facteur de croissance de façon anarchique et, ce faisant, pousserait la cellule à proliférer.

Les produits des gènes suppresseurs de tumeur *Rb* et *INK4* gouvernent la progression du cycle cellulaire à l'endroit même où agit la cycline D1 (figure 15.36). La protéine Rb suspend le cycle cellulaire au point de restriction G_1, car elle ralentit la transcription de plusieurs gènes en jeu dans l'avancement du cycle et dans la synthèse d'ADN (voir figure 14.19). Dans la cellule normale, le franchissement de ce point de restriction est régi par les complexes Cdk4/cycline-D, qui inactivent Rb par phosphorylation ; quand, dans une tumeur, *Rb* est invalidé par mutation, les cellules ont perdu un des modulateurs qui suspendent le cycle. Le gène suppresseur de tumeur *INK4*, qui code l'inhibiteur de Cdk p16, régit lui aussi le franchissement du point de restriction ; comme on l'a décrit au chapitre 14, p16 inhibe l'activité des complexes Cdk4/cycline-D ; aussi l'invalidation de *INK4* rend-elle les complexes Cdk4/cycline-D plus actifs, d'où résulte une phosphorylation démesurée de Rb.

Le produit du gène *p53* gouverne à la fois l'avancement du cycle cellulaire et l'apoptose (figure 15.37). Tout dommage causé à l'ADN induit rapidement l'expression de p53, qui stimule la transcription de l'inhibiteur de Cdk, p21 (voir figure 14.20) ; ce dernier suspend le cycle cellulaire, à la fois en tant qu'inhibiteur général des complexes Cdk/cycline et en tant qu'inhibiteur de la réplication d'ADN, puisqu'il se fixe à PCNA (antigène nucléaire de la prolifération cellulaire). Cette suspension du cycle laisserait à la cellule le temps de réparer l'ADN endommagé avant de commencer à le répliquer. Une fois p53 perdu, le cycle cellulaire ne s'interrompt plus quand l'ADN est lésé, ce qui accroît la fréquence de mutations et rend l'ensemble du génome instable. Cette instabilité génétique est un trait commun des cellules tumorales ; elle favoriserait d'autres altérations des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeur pendant que la tumeur devient de plus en plus maligne.

Figure 15.37
Rôle de p53. La protéine p53 sauvage est essentielle non seulement à l'interruption du cycle cellulaire, mais aussi au processus d'apoptose lorsque l'ADN cellulaire a été endommagé.

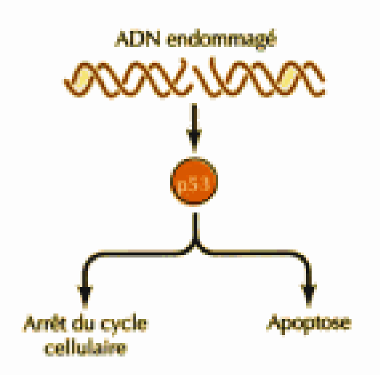
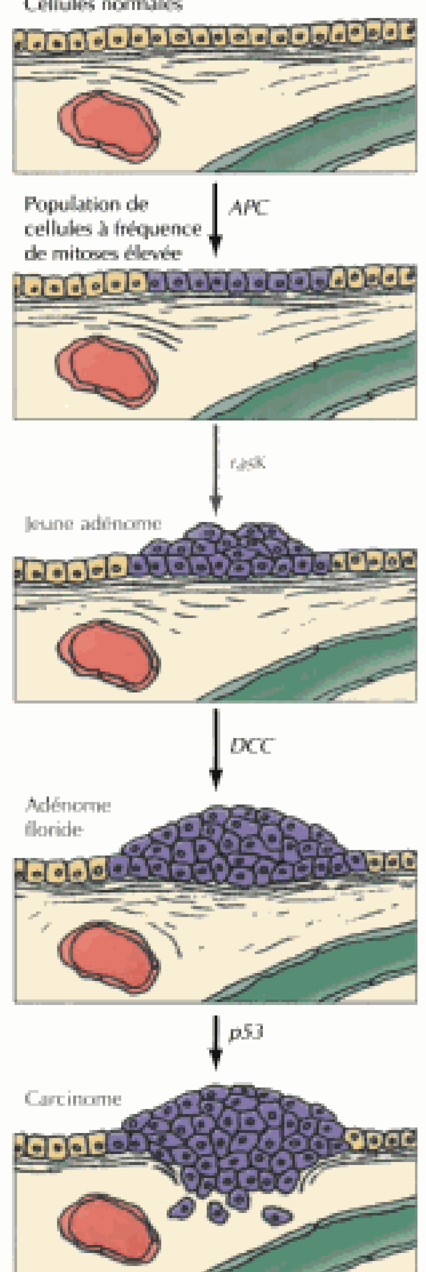


Figure 15.38
Défauts génétiques dans un carcinome du colon. Un événement précoce dans l'apparition de cette tumeur est l'inactivation de *APC*, qui fait apparaître une population cellulaire bourrée de cellules en mitose. S'ensuivent souvent des mutations de *Ras*K, fréquemment observées dans les jeunes adénomes. Quand la tumeur devient plus maligne, on observe des mutations dans les gènes *DCC* et *p53*.



Si elle régit le cycle cellulaire, la protéine p53 entre aussi en jeu dans l'apoptose enclenchée par une lésion de l'ADN. Dans les cellules de mammifère, tout dommage subsistant dans l'ADN induit habituellement le processus d'apoptose, réponse bénéfique pour l'organisme, puisqu'elle détruit les cellules portant des mutations menaçantes (par exemple des cellules précancéreuses). Par manque de p53, la cellule n'entre plus en apoptose quand son ADN est endommagé par des rayonnements ou des médicaments utilisés en chimiothérapie anticancéreuse ; ceci explique que beaucoup de tumeurs deviennent résistantes à la chimiothérapie. En outre, la perte de p53 influencerait l'apoptose induite par d'autres stimuli, tels que la carence alimentaire ou l'hypoxie. On pense que l'inactivation de p53 et la levée consécutive du processus de suicide cellulaire expliqueraient la fréquence élevée des mutations de *p53* dans les tumeurs humaines.

Les protéines codées par les gènes suppresseurs de tumeur *APC* et *DCC* interviendraient dans les interactions de cellule à cellule. Le gène *DCC* code une protéine transmembranaire apparentée aux molécules d'adhérence cellulaire de la superfamille des immunoglobulines, protéines qui régissent la sélectivité des interactions entre les cellules d'un tissu (voir tableau 12.3). La perte de DCC favoriserait la cancérisation en modifiant les relations entre cellules, qui normalement obéissent aux contraintes imposées par le contact avec leurs voisines. De même, la protéine APC interviendrait dans les interactions que le cytosquelette entretient avec la membrane plasmique au niveau des jonctions intercellulaires permanentes. On sait notamment que APC s'attache à la caténine β, qui relie les filaments d'actine aux protéines transmembranaires au niveau des jonctions étanches (voir figure 12.63). Bien que le rôle de la protéine APC nous soit inconnu, son interaction avec la caténine β suggère qu'elle module d'une façon ou d'une autre l'organisation du cytosquelette à la hauteur des plaques d'adhérence intercellulaires.

Rôle des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeur dans la cancérogenèse

Rappelons que la progression d'un cancer est un processus à plusieurs étapes au cours duquel une cellule normale se mue en une cellule de plus en plus maligne. Si on ne connaît pas encore la suite complète des événements qui génèrent un cancer chez l'Homme, il apparaît de plus en plus certain que deux étapes critiques son nécessaires à l'amorçage et à la progression d'une tumeur, à savoir l'activation de certains oncogènes et la mise hors service de gènes suppresseurs de tumeur. Si de plus en plus de gènes sont frappés dans une cellule, sa prolifération s'accélère, elle envahit les tissus voisins et génère des métastases, ce qui caractérise son pouvoir cancérogène.

On saisit le mieux le rôle joué par une accumulation de défauts génétiques dans le cas des carcinomes du colon, si bien étudiés par l'équipe de Bert Vogelstein. Ces tumeurs se caractérisent souvent par une mutation d'oncogènes *ras*K et par l'inactivation ou la délétion de trois gènes suppresseurs de tumeur distincts, à savoir *APC*, *DCC* et *p53*. Les biopsies prélevées par le chirurgien montrent souvent des lésions formées de plusieurs stages tumoraux, de sorte qu'on a pu trouver une corrélation entre ces altérations génétiques et tel ou tel stage de malignité de la tumeur.

Ces travaux indiquent que l'inactivation de *APC* prélude à l'apparition de la tumeur. La transmission génétique de gènes *APC* mutants provoque une hypertrophie de la muqueuse colique qui se manifeste par la présence de nombreux adénomes. Cependant, on observe aussi des mutations de *APC* chez des patients atteints de carcinomes coliques non congénitaux, qu'on diagnostique précocement chez les sujets atteints. Plus tard, on voit apparaître des mutations dans les gènes *ras*K, qu'on retrouve aussi dans des adénomes de taille petite et moyenne. Par contre, ce n'est qu'aux stades ultérieurs de la progression tumorale qu'on observe systématiquement une

inactivation des gènes *DCC* et *p53* ; on trouve rarement ces gènes mutés dans les jeunes adénomes, mais ils sont courants dans les adénomes avancés et les carcinomes malins. Il semble donc que la perte de ces gènes suppresseurs de tumeur coïncident, dans le cancer du colon, avec les dernières étapes d'une propension à la malignité et non avec les étapes initiales d'amorçage du processus de cancérisation.

Si les étapes décrites ci dessus correspondent souvent à l'ordre dans lequel apparaissent les altérations de gènes, il n'en va pas toujours ainsi. Parfois on trouve, par exemple, une mutation de *p53* dans un adénome précoce. Ce ne serait pas l'ordre d'apparition de ces diverses mutations, mais l'accumulation des lésions géniques qui causerait le cancer du colon ; l'apparition d'autres types de carcinomes, par exemple celui du sein ou du poumon, seraient due à ce que de plus en plus d'oncogènes et de gènes suppresseurs de tumeur sont touchés dans une même cellule. Il semble donc que la perte progressive de la commande exercée sur sa prolifération par la cellule cancéreuse soit l'aboutissement d'une somme d'anomalies dans les produits des gènes qui régissent la prolifération, la différenciation et la survie cellulaires.

APPLICATIONS DE LA BIOLOGIE MOLÉCULAIRE À LA PRÉVENTION ET AU TRAITEMENT DES CANCERS

On connaît maintenant beaucoup de défauts moléculaires qui provoquent l'apparition de nombreux cancers chez l'Homme. Le cancer n'est cependant pas seulement un sujet scientifique parmi d'autres, c'est une maladie redoutable qui tue 25 % des citoyens des USA. C'est donc l'occasion de se demander si notre compréhension accrue du phénomène de cancérisation va aboutir à une meilleure prévention et à un traitement plus efficace des cancers. La Société demandera donc aux jeunes chercheurs d'exploiter les découvertes de la biologie moléculaire pour soutenir l'action des cancérologues.

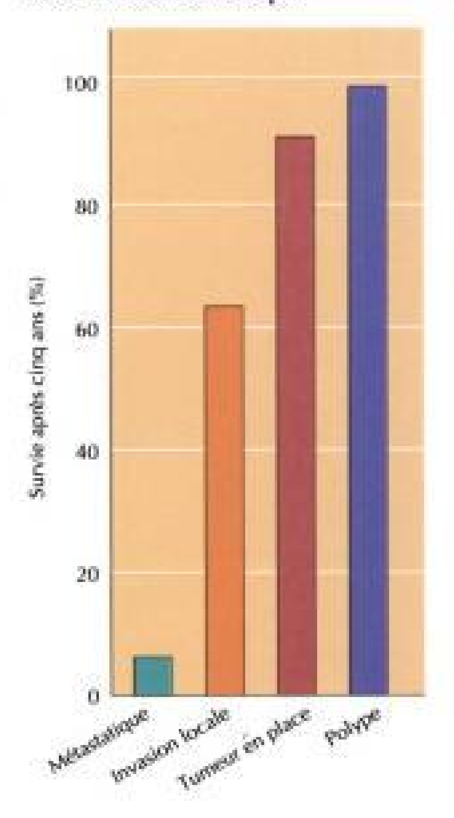
Prévention et diagnostic précoce

Le moyen le plus efficace de lutter contre le cancer serait d'empêcher l'apparition de cette maladie, mais faute de pouvoir le faire, un autre moyen de lutte efficace est de déceler les stades précoces de son évolution, avant que les cellules anormales ne deviennent malignes. Beaucoup de cancers localisés guérissent sous la main du chirurgien ou du radiothérapeute, à condition qu'ils soient diagnostiqués avant qu'ils ne forment des métastases dans les autres tissus ; grâce à une petite intervention chirurgicale on guérit facilement, par exemple, les stades encore bénins du cancer colique (adénomes) (figure 15.39). Même dans le cas de carcinomes bien localisés, le taux de guérison atteint environ 90 %, mais la survie des patients tombe à 50 % quand la tumeur a envahi les tissus voisins ou les ganglions lymphatiques, et à 10 % quand la carcinome colique à formé des métastases. On voit donc à quel point le dépistage précoce de ces lésions détermine l'évolution de la maladie.

La principale application de la biologie moléculaire à la prévention et au diagnostic précoce du cancer est de repérer les individus porteurs d'une susceptibilité congénitale à développer un cancer ; cette susceptibilité est due soit à des mutations dans les gènes suppresseurs de tumeur (au moins dans un cas connu, *ret*), soit dans des gènes qui réparent l'ADN, par exemple les gènes de réparation des mésappariements qui sont responsables du cancer colique congénital non polypeux (voir Médecine moléculaire, au chapitre 5). Les mutations de ces gènes se décèlent par criblage génétique, un test qui identifie les individus indemnes, mais à haut risque.

Outre qu'il contribue à orienter le planning familial, l'examen préventif des individus à haut risque permet de déceler tôt et de traiter de façon plus efficace certains types de cancers ; pour déceler les adénomes du colon, par

Figure 15.39
Espérance de vie des patients atteints d'un cancer du colon. Espérance de vie à cinq ans de patients dont la lésion a été diagnostiquée au stade d'adénome (polype), au stade de carcinome non invasif, au stade de carcinome envahissant les tissus voisins et les ganglions lymphatiques et au stade de carcinome métastatique.



exemple, il suffit d'effectuer une colonoscopie et de réséquer les adénomes avant qu'ils ne deviennent malins. Chez les patients menacés de polypose adénomateuse congénitale (due à une mutation congénitale du gène suppresseur de tumeur *APC*), vont apparaître au cours des vingt premières années de la vie des centaines d'adénomes ; aussi doit-on leur réséquer le colon, sinon certains de ces polypes deviendront des carcinomes malins. Néanmoins, les individus souffrant de cancer colique congénital non polypeux seront sujets, à un âge plus avancé, à quelques polypes ; ce sont eux qui doivent bénéficier régulièrement d'une colonoscopie et d'un traitement par des substances qui empêchent la cancérisation de leurs lésions.

Il est rare que des déficits dans des gènes connus se transmettent directement de parent à enfant ; ces cas ne représentent qu'une toute petite proportion de l'ensemble des cancers. La susceptibilité congénitale la plus courante au cancer concerne le cancer colique non polypeux, qui compte pour environ 15 % des cancers du colon et près de 2 % des cancers aux Etats-Unis. Néanmoins, des gènes de susceptibilité au cancer, encore inconnus, interviendraient dans une grande proportion des cancers courants de l'adulte, comme ceux du sein, du colon et du poumon. Il est donc important que les chercheurs continuent à isoler de nouveaux gènes de susceptibilité, car ces découvertes auront des applications médicales. À ces individus porteurs de gènes de susceptibilité au cancer, on devrait conseiller d'éviter le contact avec les cancérogènes connus (fumée de tabac pour le cancer du poumon, par exemple) et de se soumettre régulièrement au dépistage précoce, qui permet de s'attaquer à des tumeurs encore bénignes. À condition qu'elle se concrétise par des mesures préventives et des tests de dépistage, l'identification des sujets susceptibles fera baisser nettement la mortalité due au cancer.

Diagnostic moléculaire

L'analyse à l'échelle moléculaire d'oncogènes et de gènes suppresseurs de tumeur impliqués dans tel ou tel type de tumeur peut fournir des renseignements utiles au diagnostic d'un cancer ou au suivi de son traitement ; certaines applications de cette sorte de diagnostic moléculaire sont déjà de pratique courante. Dans certains cas, des mutations apparues dans un oncogène servent de marqueur moléculaire pour suivre l'évolution de la maladie pendant un traitement ; c'est le cas de la translocation de *abl* dans la leucémie myéloïde chronique. Rappelons que cette translocation aboutit à fusionner *abl* avec le gène *bcr*, ce qui enclenche l'expression de la protéine oncogène Bcr/Abl (voir figure 15.25). Grâce à la réaction de réplication exponentielle par la polymérase (voir figure 3.27), on dispose d'une méthode sensible pour détecter l'oncogène recombinant *bcr/abl* dans les cellules leucémiques et, ce faisant, on peut suivre l'effet du traitement appliqué au patient.

Dans d'autres cas, la détection de mutations dans un oncogène ou dans un gène suppresseur de tumeur donné fournit une information qui oriente le choix d'une conduite thérapeutique adéquate ; ainsi, l'amplification de N-*myc* dans un neuroblastome ou de *erb*B-2 dans un carcinome du sein ou de l'ovaire permet de prédire une évolution rapide vers la malignité ; un patient porteur de ces oncogènes amplifiés profitera au maximum de la méthode la plus agressive. Vu le rôle de p53 dans l'apoptose due à une lésion de l'ADN, l'étude des mutations survenues dans *p53* nous fera prévoir le comportement des cellules au cours d'un traitement par radiothérapie ou par chimiothérapie. À mesure que les données s'accumulent sur le rôle joué par telle ou telle anomalie génétique dans le comportement d'une tumeur donnée, cette recherche à l'échelle moléculaire prendra de plus en plus de place dans le diagnostic du cancérologue.

Traitement

La question pressante est cependant de savoir si la découverte d'oncogènes et de gènes suppresseurs de tumeur mènera à la découverte de nouveaux médicaments sélectivement actifs contre les cellules cancéreuses. La plupart

laquelle les chercheurs peuvent mettre au point un médicament tout à fait sélectif ?

Malheureusement pour le patient en traitement, les oncogènes ne sont pas particuliers aux cellules tumorales ; comme certains proto-oncogènes jouent un rôle important dans la cellule normale, on doit s'attendre à ce que tout inhibiteur général de l'expression ou du fonctionnement des oncogènes interfère tant sur les cellules normales que sur les cellules tumorales. L'action anticancéreuse de médicaments basés sur la destruction des oncogènes ne va pas du tout de soi, mais on peut espérer qu'à la longue elle devienne réalité.

Il se fait qu'on dispose maintenant, dans le traitement de la leucémie promyélocytaire aiguë, d'une thérapie dirigée contre un oncogène particulier ; cette leucémie résulte d'une translocation chromosomique dans laquelle le gène codant le récepteur d'acide rétinoïque (*RARα*) s'est soudé à un autre gène, pour donner l'oncogène *PML/RARα*. Il semble que la protéine PML/RARα serve en partie à bloquer la différenciation cellulaire ; en effet, ces cellules leucémiques reprennent leur différenciation quand on traite le patient par de hautes doses d'acide rétinoïque, qui contrecarre semble-t-il l'effet inhibiteur de la protéine oncogène PML/RARα. La cure d'acide rétinoïque arrive à guérir la plupart des patients, quoique la réponse soit temporaire et que l'on observe des récidives. En combinant l'acide rétinoïque et la chimiothérapie classique, on diminue notablement la fréquence des récidives ; l'usage de l'acide rétinoïque est donc bénéfique au traitement de la leucémie promyélocytaire aiguë ; c'est le premier médicament mis au point pour son action spécifique contre une protéine oncogène.

On s'affaire à présent à trouver une substance dirigée contre les protéines Ras, qu'on trouve dans de nombreuses tumeurs humaines. Les protéines Ras sont acheminées dans la membrane plasmique et y restent ancrées grâce au groupe isoprénique farnésyle qui s'est attaché à leur extrémité carboxyle (voir figure 7.30). Comme cette substitution est une modification de type peu courant, on a pensé que les inhibiteurs de farnésylation seraient cytostatiques ; ils se sont révélés d'étonnants inhibiteurs sélectifs de l'expression des protéines oncogènes Ras et on est en train d'évaluer leur potentiel thérapeutique dans les cancers humains.

Les recherches actuelles portent aussi sur la découverte d'inhibiteurs d'autres protéines oncogènes, par exemple de protéine-tyrosine kinases ou de facteurs de transcription. On envisage aussi de mettre au point des substances qui entrent en interaction avec la machinerie du cycle cellulaire, pour subvenir au déficit de gènes suppresseurs de tumeur, tel que *Rb* ou *INK4*. Une autre filière encore est de trouver des substances qui induisent l'apoptose dans les cellules cancéreuses, et qui agiraient en inhibant Bcl-2 ou en palliant le déficit de p53. Si l'impact de la biologie moléculaire sur le traitement des cancers reste à démontrer, l'exploitation des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeur comme cible des traitements anticancéreux est l'occasion pour les futurs biologistes moléculaires d'appliquer leurs talents et l'esprit d'émulation qui les habite.

ONCOGÈNES

oncogène, ***src*****,** ***ras*****,** ***raf***

Oncogènes rétroviraux : Le premier oncogène identifié fut le gène *src* de RSV. Les travaux ultérieurs ont permis d'identifier plus d'une douzaine d'oncogènes chez divers rétrovirus.

proto-oncogène

Proto-oncogènes : Les oncogènes rétroviraux proviennent de gènes cellulaires normaux apparentés, appelés proto-oncogènes. Les oncogènes sont des formes exprimées de façon déréglée ou des formes mutées des proto-oncogènes correspondants.

ras**,** ***c-myc*****,** ***abl*****, N-*****myc*****, erbB-2**

Oncogènes en jeu dans les cancers humains : Dans les cancers humains, plusieurs oncogènes doivent leur activation à une mutation ponctuelle, à un réarrangement d'ADN ou a une amplification de gène. Parmi ces oncogènes de tumeurs humaines, certains, comme les gènes *ras*, sont les homologues cellulaires d'oncogènes découverts d'abord chez des rétrovirus.

Fos, Jun, PRAD1, ErbA, PML/RARa, ***bcl-2***

Rôle des produits des oncogènes : La plupart des protéines oncogènes font partie des voies de signalisation qui stimulent la prolifération cellulaire. Le gène qui code la cycline D1 est aussi un oncogène potentiel, car il stimule la course du cycle cellulaire. D'autres protéines oncogènes interfèrent avec la différenciation cellulaire ; Bcl-2 inhibe l'apoptose.

GÈNES SUPPRESSEURS DE TUMEUR

gène suppresseur de tumeur, Rb, p53, INK4, APC, DCC

Identification de gènes suppresseurs de tumeur : À l'inverse des oncogènes, les gènes suppresseurs de tumeur inhibent le développement des tumeurs. Le prototype de ces gènes, *Rb*, fut mis au jour en étudiant la transmission du rétinoblastome. La perte ou l'invalidation par mutation de *Rb* et d'autres gènes suppresseurs de tumeur, tel que *p53*, induisent l'apparition de toutes sortes de tumeurs chez l'Homme.

NF1, WT1

Mode d'action du produit des gènes suppresseurs de tumeur : Les protéines codées par la plupart des gènes suppresseurs de tumeur inhibent la prolifération des cellules. Les protéines Rb, INK4 et p53 s'opposent à l'avancement du cycle cellulaire. Comme p53 est aussi requis dans l'apoptose induite par une lésion de l'ADN et d'autres stimuli, son invalidation favorise la survie des cellules tumorales. Les protéines codées par les gènes suppresseurs de tumeur *DCC* et *APC* moduleraient les interactions entre cellules ainsi que l'organisation du cytosquelette.

Rôle des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeur sur l'évolution d'une tumeur : Le caractère de plus en plus malin d'un cancer humain est dû à des mutations dans les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeur. On pense que l'accumulation des lésions frappant ces gènes produit les anomalies observées dans la prolifération, la différenciation et le pouvoir de survie qui caractérisent la cellule cancéreuse.

APPLICATIONS DE LA BIOLOGIE MOLÉCULAIRE À LA PRÉVENTION ET AU TRAITEMENT DU CANCER

Prévention et dépistage précoce : On peut guérir beaucoup de cancers à condition de les dépister au premiers stades de leur évolution. Les tests génétiques capables d'identifier les individus congénitalement susceptibles favorisent la détection précoce des cancers et sont essentiels à un traitement précoces des individus à haut risque.

Diagnostic moléculaire : La découverte de mutations dans les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeur contribue au diagnostic du cancer et au suivi de la thérapie.

Réponses aux questions

Chapitre 1

1. L'abondance de O_2 dans l'atmosphère terrestre est due aux réactions de la photosynthèse.

2. Les levures possèdent une paroi rigide, les cellules animales en sont dépourvues.

3. L'indice de réfraction de l'air est égal à 1,0, celui de l'huile est d'environ 1,4. Comme le pouvoir de résolution = 0,61 $\lambda/\eta \sin \alpha$ (α est l'indice de réfraction du milieu), on verra l'objet avec une définition de 0,3 µm au lieu de 0,2 µm si l'espace qui le sépare de l'objectif est de l'air au lieu d'huile.

4. On devra choisir la centrifugation zonale. Dans une centrifugation à l'équilibre, les deux organites se concentreraient dans la même bande de densité.

5. Le génome du virus du sarcome de Rous (10 000 paires de base) est 100 000 fois plus petit que celui de la cellule de poulet.

Chapitre 2

1. La formation de membranes stables est due au caractère amphipathique des phospholipides.

2. Comme les résidus de phénylalanine sont hydrophobes, on les trouvera vraisemblablement dans des hélices α ou dans des feuillets β occupant le cœur de la protéine. On doit s'attendre à ce que les boucles reliant ces éléments de structure secondaire contiennent des acides aminés hydrophobes.

3. L'aspartate est un acide aminé dont la chaîne latérale acide attire les résidus d'acide aminé basiques des substrats de la trypsine. Quand on remplace l'aspartate par de la lysine (acide aminé basique), on empêche la liaison du substrat et la réaction catalytique.

4. En plaçant les valeurs données dans l'équation

$$\Delta G = \Delta G^{\circ\prime} + RT \ln \frac{[B][C]}{[A]}$$

on obtient une valeur de : ΔG = -1,93 kcal mol^{-1}. La réaction se déroule donc de gauche à droite, A donnant B + C dans la cellule.

5. Comme les acides gras saturés sont plus réduits que les non saturés, leur oxydation complète fournit plus d'énergie que celle des acides gras insaturés.

6. Pour renverser la voie glycolytique vers une synthèse de glucose, on doit contourner les réactions exergoniques de la glycolyse *via* d'autres réactions, couplées à l'utilisation d'ATP et de NADH.

7. La structure en hélice α permet aux groupes =CO et =NH des liaisons peptidiques de former entre eux des liaisons hydrogène, ce qui neutralise leur caractère polaire.

Chapitre 3

1. La carte génétique est $z \overset{0,5}{\text{———}} x \overset{0,2}{\text{——}} y$

2. Comme UGC code aussi la cystéine, cette mutation est sans effet sur la fonction de l'enzyme, mais

3. Le promoteur contenant la boîte TATA peut être transcrit *in vitro* en présence de TBP ou de TFIID. Cependant, le promoteur Inr requiert TFIID, car la séquence Inr est reconnue par les TAFs et non par TBP.
4. L'élément de séquence serait vraisemblablement le site de fixation d'un répresseur particulier à un tissu.
5. Deux domaines de fixation à l'ADN différents pourraient s'attacher au domaine d'activation du facteur par un épissage à choix multiple singulier.

Chapitre 7

1. Il faut y introduire une séquence de Shine-Delgarno.
2. La polyadénylation est un des importants mécanismes de régulation de la traduction au début de l'embryogenèse. En bloquant la polyadénylation, on empêchera la traduction de beaucoup d'ARNm présents dans l'œuf fécondé.
3. L'accumulation sélective de protéines du cytosol par le lysosome requiert le chaperon Hsp70, car le déploiement des chaînes polypeptidiques en question est indispensable à leur transfert à travers la membrane du lysosome. Ce chaperon n'est pas nécessaire à la fusion de la membrane des vésicules avec celle des lysosomes pendant le processus d'autophagie.
4. La phospholipase détacherait de la surface cellulaire une protéine attachée par une ancre GPI, mais pas une protéine transmembranaire.
5. Toute mutation d'une sérine en thréonine serait sans effet, car ces deux résidus sont tous deux phosphorylés par les mêmes protéine kinases. Par contre, toute mutation d'une sérine en alanine empêchera la phosphorylation de la protéine et, partant, l'activation de sa fonction enzymatique.

Chapitre 8

1. N'étant plus phosphorylé en ces sites, le facteur de transcription serait importé de façon contitutive dans le noyau pour y activer l'expression des gènes cible.
2. En invalidant le signal d'exportation nucléaire, on provoque la rétention de la protéine par le noyau.
3. Un isolateur empêche un amplificateur d'influencer des promoteurs siégeant dans des domaines chromosomiques séparés. L'insertion d'un isolateur entre E et P1 inhiberait la transcription tant à partir de P1 que de P2, tandis que l'insertion d'un isolateur entre P1 et P2 n'inhiberait que la transcription à partir de P2.
4. Comme la formation d'un nucléole dépend de la transcription des gènes d'ARNr, elle est bloquée par un traitement à l'actinomycine D. Néanmoins, comme les gènes d'ARNr sont transcrits par l'ARN polymérase I, l'α-amanitine est sans effet.
5. Les lamines de type B sont modifiées par farnésylation. Leur groupe lipidique les force à rester collées aux vésicules membraneuses après démembrement de l'enveloppe nucléaire. Par contre, les lamines de type A et C sont libérées dans le cytosol.

Chapitre 9

1. La séquence signal acheminerait la chaîne polypeptidique naissante dans le RE et, ce faisant, la protéine serait sécrétée *via* la voie de sécrétion générale.
2. Ces protéines ne peuvent pas s'insinuer dans le RE ; elles restent donc dans le cytosol.
3. Les groupes glucidiques sont greffés dans la lumière du RE et de l'appareil de Golgi, qui sont les équivalents topologiques du milieu extracellulaire.
4. La protéine, normalement cytosolique, est dépourvue de séquence signal et ne pénètre pas dans le RE. Aussi, l'addition d'un signal d'adressage au lysosome serait sans effet. Par contre, l'addition de pareil signal à une protéine normalement sécrétée la ferait passer de l'appareil de Golgi dans un lysosome.
5. Si l'appareil de Golgi était incapable de fabriquer du mannose 6-phosphate, toute protéine normalement dirigée vers le lysosome serait déroutée vers la voie de sécrétion.

Chapitre 10

1. La composante potentiel membranaire du gradient électrochimique entraîne l'insertion membranaire et la translocation des préséquences à charge positive des protéines mitochondriales.
2. Dans ces conditions, ΔG vaut approximativement $-1{,}4$ kcal mol^{-1}. Environ neuf protons devraient donc franchir la membrane pour assurer la synthèse d'une molécule d'ATP.
3. Ce sont des compartiments équivalents au point de vue topologique.
4. Contrairement à celle de la mitochondrie, la membrane du chloroplaste n'est le siège d'aucune différence de potentiel. Aussi la charge des peptides de transit n'intervient-elle pas dans la translocation de la protéine.
5. Comme il faut deux électrons de haute énergie pour rompre une molécule d'eau, 24 électrons d'énergie élevée sont requis pour la synthèse d'une molécule de glucose. Le passage de ces électrons à travers les deux photosystèmes génère 12 molécules de NADPH et de 16 à 24 molécules

d'ATP, selon la stoéchiométrie du pompage de protons au niveau du complexe du cytochrome *bf*. Puisque 18 molécules d'ATP sont requises pour un cycle de Calvin, la synthèse de glucose engloutira d'autres molécules d'ATP, fournies par le flux cyclique d'électrons.

6. Trois des quatre atomes convertis en glycolate reviennent dans le chloroplaste pour être réinjectés dans le cycle de Calvin.

Chapitre 11

1. La cytochalasine empêche l'actine de polymériser ; elle inhibera donc le déplacement de la cellule *via* la formation de pseudopodes, mais n'agira pas sur la motilité flagellaire, basée, elle, sur le glissement des microtubules.
2. Le sens du glissement des têtes de myosine est fixé par la polarité des filaments d'actine. Si les filaments d'actine étaient dépourvus de polarité, le glissement des filaments de myosine entre les filaments d'actine ne donnerait pas de translation générale des molécules de myosine dans un sens bien déterminé.
3. Non. Seules les cellules épithéliales expriment de la kératine.
4. Puisque la colchicine inhibe la polymérisation des microtubules, elle va interférer avec la répartition des chromosomes, mais n'influencera pas la cytocinèse, car celle-ci est due à la contraction du système actine-myosine de l'anneau contractile.
5. En asservissant les doublets microtubulaires des cils les uns aux autres, la nexine transforme le glissement de chacun des microtubules en un mouvement d'incurvation qui produit le battement du cil. En l'absence de nexine, les microtubules ne feraient que glisser les uns sur les autres.

Chapitre 12

1. Les porines introduites dans la membrane plasmique vont laisser diffuser librement les ions et les petites molécules entre le cytosol et le milieu extérieur, une catastrophe pour la cellule.
2. Si $C_e/C_i = 10$, le potentiel membranaire d'équilibre de K^+ calculé d'après la formule de Nernst vaut –58 mV. Le potentiel membranaire de repos réel diffère du potentiel d'équilibre de K^+ parce que la membrane plasmique est quelque peu perméable aux autres ions.
3. La paroi de la cellule végétale empêche la cellule de gonfler et y maintient une pression de turgescence.
4. Comme les jonctions lacunaires laissent passer librement les ions d'une cellule à ses voisines, les molécules de CFTR normales exprimées dans une cellule donnée de l'épithélium serviront de tunnels à Cl^- fonctionnels dans les cellules adjacentes.
5. La localisation correcte des transporteurs garantissant le transport actif et la diffusion facilitée est essentielle au fonctionnement polarisé des cellules épithéliales qui transfèrent le glucose de la cavité intestinale au courant sanguin. Les jonctions étanches empêchent ces transporteurs de diffuser d'un domaine à l'autre de la membrane plasmique et scellent les interstices qui séparent les cellules épithéliales les unes des autres.

Chapitre 13

1. En faisant monter le taux d'AMPc, l'inhibition de l'AMPc phosphodiestérase stimulerait la prolifération des cellules.
2. La molécule recombinée se comportera comme un récepteur d'adrénaline couplé à G_i. Ainsi l'adrénaline inhibera l'adénylyl cyclase et fera baisser le taux d'AMPc dans le cytosol. L'acétylcholine sera sans effet, car elle ne s'attache pas au récepteur recombiné.
3. Sous forme de monomère, PDGF ne provoque pas la dimérisation du récepteur. Cette étape étant essentielle à l'émission du signal par les récepteurs à activité de protéine-tyrosine kinase, un PDGF monomérique est incapable de stimuler son récepteur.
4. La protéine phosphatase 1 déphosphoryle des résidus sérine qui ont été phosphorylés par la protéine kinase A. Les gènes sensibles à l'AMPc sont activés par CREB, qui est phosphorylé par la protéine kinase A ; aussi toute surexpression de la protéine phosphatase 1 va inhiber l'induction de ces gènes. Cependant, la protéine phosphatase 1 n'aura aucune influence sur l'activité des tunnels ouverts par un ligand comme l'APMc, car ces tunnels sont ouverts directement par séquestration d'AMPc et non par phosphorylation d'une protéine.
5. L'hydrolyse de PIP_2 par la phospholipase C produit du diacylglycérol et de l'IP_3, lequel provoque la libération de Ca^{2+} par le réticulum endoplasmique. L'hydrolyse de PIP_2 mettra donc en marche PKC-α et PKC-ε. L'hydrolyse de la phosphatidylcholine produit du diacylglycérol, mais pas d'IP_3 ; l'hydrolyse de la phosphatidylcholine suffit donc à activer PKC-ε, mais pas PKC-α.
6. Raf agit en aval de Ras dans la voie de la MAP kinase. Tout Raf activé peut donc contourner l'influence d'un Ras négatif dominant, mais aucun Ras activé ne peut vaincre les effets inhibiteurs d'un Raf négatif dominant. MEK agit en aval de Raf ; dès qu'il est activé, MEK peut donc contrecarrer l'influence des formes négatives dominantes de Ras et de Raf.

Chapitre 14

1. G_1 = 16 h, S = 9 h, G_2 = 4 h et M = 1 h.
2. Une des cellules filles recevrait deux exemplaires du chromosome mal aligné et l'autre en serait privée.
3. Dans une cellule normale, toute surexpression de p16 empêcherait le cycle de progresser au-delà du point de restriction situé en G_1. Puisque Rb est la cible principale des complexes Cdk4/cycline-D, toute cellule tumorale dépourvue de Rb actif serait insensible à une surexpression de p16.
4. La lamina nucléaire resterait intacte.
5. L'anaphase se passerait normalement, mais MPF resterait actif, empêchant le noyau de se reformer, la chromatine de se décondenser et la cytocinèse de s'effectuer.
6. Les ovocytes de ces souris ne pourraient interrompre leur cycle à la métaphase II.

Chapitre 15

1. La sélection clonale accroît la malignité de la tumeur parce qu'elle favorise la prolifération des cellules tumorales qui se divisent le plus rapidement.
2. Comme E7 s'attache à Rb, il provoquera la transformation en coopérant avec l'antigène T muté. E6 en est incapable, car il entre en interaction avec p53, pas avec Rb.
3. Le gène *gsp* code le protomère α de G_s, qui stimule l'adénylyl cyclase. Aussi, ne se comportera-t-il pas comme un oncogène dans des cellules dont la prolifération est inhibée par l'AMP cyclique.
4. *INK4* code p16, l'inhibiteur de Cdk qui invalide les complexes Cdk4/cycline-D. Comme la phosphorylation de Rb est la clé de l'action des complexes Cdk4/cycline-D, une surexpression de p16 sera sans effet dans des cellules où Rb ne fonctionne plus.
5. Des cellules exprimant la p53 sauvage seront plus sensibles, car p53 intervient dans l'apoptose induite par une lésion de l'ADN.

AMPc phosphodiestérase Enzyme qui hydrolyse l'AMP cyclique.

Amphipathique Qui possède à la fois au moins un domaine hydrophile et un domaine hydrophobe.

Amplificateur Séquence de régulation de la transcription siégeant éventuellement loin du promoteur qui lui est sensible.

Amplification (de gène) Augmentation du nombre d'exemplaires d'un gène due à une réplication répétée d'un segment d'ADN.

Anaphase Etape de la mitose pendant laquelle les chromatides sœurs de séparent pour gagner chacune un pôle du fuseau.

Anaphase A Déplacement des chromosomes fils vers les pôles du fuseau lors de la mitose.

Anaphase B Écartement des pôles du fuseau lors de la mitose.

Angiogenèse Formation de nouveaux vaisseaux sanguins.

Anneau contractile Ensemble d'actine et de myosine II formé sous la membrane plasmique de la région équatoriale durant la mitose ; il contribue à la cytodiérèse.

Anticodon Séquence de trois bases d'une des boucles d'un ARN de transfert qui s'apparie par complémentarité de bases à la séquence d'un codon d'un ARNm

Anticorps Globuline produite par les lymphocytes B, qui se fixe à une molécule étrangère.

Antigène Toute substance contre laquelle l'organisme fabrique des anticorps spécifiques.

Antiport Transport de molécules en sens opposés à travers une membrane.

Apical (pôle ~) Surface d'une cellule épithéliale polarisée qui jouxte le milieu extérieur de l'organisme.

Apoptose Suicide cellulaire programmé, caractérisé par une fragmentation de l'ADN chromosomique, une condensation de la chromatine et un démembrement du noyau et du reste de la cellule.

Arabidopsis thaliana Petite plante à fleur servant de modèle en biologie moléculaire et en embryologie chimique.

Archaebactéries Une des deux grandes classes de procaryotes, dont plusieurs espèces supportent des conditions physico-chimiques extrêmes rappelant celles qui régnaient dans la biosphère primitive.

ARF Protéine fixant GTP, en jeu dans le bourgeonnement de vésicules sur le lamelles du *trans*-Golgi.

ARN messager (ARNm) Molécule d'ARN qui sert de moule à la synthèse d'une chaîne polypeptidique.

ARN polymérase Enzyme qui catalyse la synthèse d'ARN.

ARNase H Enzyme qui détruit le brin ARN des hybrides bicaténaires ADN-ARN.

ARNase P Ribozyme qui coupe dans le bout 5' des pré-ARNt.

ARN de transfert (ARNt) Molécule d'ARN servant d'adaptateur entre un acide aminé et le codon correspondant d'un ARNm au cours de sa traduction en protéine.

Aster (microtubules de l'~) Microtubules du fuseau mitotique qui sont tournés vers la périphérie de la cellule.

ATP (5'-triphosphate d'adénosine) Nucléotide pourvu de deux liaisons riches, qui est une réserve universelle d'énergie libre cellulaire.

ATP synthase Complexe protéique transmembranaire qui couple un flux énergétiquement favorisé de protons à la synthèse d'ATP.

Atténuation transcriptionnelle Mécanisme de régulation qui permet ou refuse à l'ARN polymérase II d'achever de traduire au delà d'un site déterminé de la matrice d'ADN.

Autocrine (messager ~) Type de signal duquel la cellule émettrice est aussi une des cellules réceptrices.

Auto-épissage Pouvoir qu'ont certains ARN d'exciser leurs propres introns et de réunir leurs exons.

Autophagie Destruction des protéines et des organites cytoplasmiques par emprisonnement dans des vésicules du réticulum endoplasmique qui fusionnent avec les lysosomes.

Autoradiographie Mise en évidence du rayonnement photosensibilisateur d'un isotope radioactif par apposition directe d'une émulsion photographique sur la préparation biologique contenant l'isotope.

Axonème Faisceau de microtubules (2 + 9) assurant l'architecture et la motilité des cils et des flagelles.

Bactériophage Virus infectant une cellule bactérienne.

Banque d'ADN recombinant (recombiné) Collection complète des clones recombinants d'ADNc d'une cellule.

Banque génomique (génothèque) Collection de clones de molécules d'ADN représentant la totalité d'un génome.

Basale (lame ~) Mince trame de matrice extracellulaire soutenant les cellules des épithélium et enrobant les cellules musculaires et adipeuses ainsi que les nerfs périphériques.

Bicouche phospholipidique Structure fondamentale des biomembranes, où les chaînes hydrophobes d'acide gras forment le cœur de la membrane et les groupes polaires ses deux faces, en contact avec les phases aqueuses.

Boîte TATA Séquence d'ADN régulatrice occupant le promoteur de beaucoup de gènes eucaryotes transcrits par l'ARN polymérase II.

Boîte TATA (protéine se fixant à la ~)(TBP) Facteur de transcription général s'attachant directement à la boîte TATA.

Brin avancé Brin d'ADN synthétisé en continu dans le sens du déplacement de la fourche de réplication.

Brin retardé Brin d'ADN synthétisé de manière discontinue en sens opposé au mouvement de la fourche de réplication sous forme de fragments d'Okazaki qu'une ligase soude ensuite à son prédécesseur.

Coenzyme A (CoA) Coenzyme qui active et transfère des acides gras.

Coenzyme Q Petite molécule liposoluble qui transfère des électrons d'un complexe protéique à l'autre dans la chaîne de transport d'électrons mitochondriale.

Coiffe de 5' méthylguanosine Structure du bout 5' des ARNm d'eucaryote ; elle résulte d'une greffe de groupe GTP méthylé et d'une méthylation de riboses voisins.

Colcémide Médicament qui empêche la polymérisation des microtubules.

Colchicine Médicament qui inhibe la polymérisation des microtubules.

Collagènes Grande famille de protéines formant la charpente fibreuse de la matrice extracellulaire.

Collenchyme Cellule végétale vivante de soutien, caractérisée par une paroi très épaisse.

Complémentaire (ADN). Voir ADNc

Corpuscule basal Structure apparentée au centriole sur laquelle naissent les microtubules de l'axonème et qui arrime les cils et les flagelles à la périphérie de la cellule.

Correction sur épreuves Elimination sélective de bases mésappariées par l'ADN polymérase.

Cortex cellulaire Film cytoplasmique qui contient le réseau d'actine soutenant la membrane plasmique.

Corticostéroïdes Hormones stéroïdes fabriquées par la corticosurrénale.

Cosmide Vecteur de clonage formé de séquences du bactériophage λ, d'une séquence de résistance à un antibiotique et d'une origine de réplication ; on peut y placer un insert d'ADN allant jusqu'à 45 kb.

Crête Repli de la membrane mitochondriale interne faisant saillie dans la matrice.

Cristallographie par les rayons X Méthode où la diffraction des rayons X par les structures répétitives d'un cristal de protéine révèle l'arrangement des atomes de la molécule.

Cryofracture Traitement où l'échantillon subit une congélation instantanée dans l'azote liquide puis une fracture qui fend la bicouche lipidique pour exposer les reliefs de ses faces internes.

Cyanobactéries Procaryotes les plus volumineux et les plus complexes chez lesquels serait apparue la photosynthèse.

Cyclines Famille de protéines qui modulent l'activité de certaines protéine kinases et commandent le franchissement des étapes du cycle cellulaire.

Cyclique (AMP-)(AMPc) Voir AMP cyclique

Cyclique (GMP-)(GMPc) Voir GMP cyclique

Cytochalasine Substance qui bloque l'allongement des filaments d'actine.

Cytochrome oxydase Complexe protéique de la chaîne de transport d'électrons mitochondriale qui transfère les électrons du cytochrome *c* à O_2.

Cytocinèse (cytodiérèse) Partition en deux du cytoplasme d'une cellule après la mitose ou la méiose.

Cytokines Famille de facteurs de croissance qui déclenchent la prolifération et la différenciation des cellules sanguines et des lymphocytes.

Cytomètre de flux Appareil qui mesure la fluorescence de chaque cellule passant dans un rayonnement approprié.

Cytosine Pyrimidine qui s'apparie à la guanine.

Cytosquelette Réseau de filaments protéiques parcourant le cytoplasme des cellules d'eucaryote ; la cellule lui doit sa forme et sa motilité.

Départ (point de –)(START) Point de la phase terminale de G_1 du cycle cellulaire de la levure ; une fois franchi le point de départ, la cellule s'engage dans la phase S et complétera un cycle de division.

Desmosome Région d'ancrage entre cellules épithéliales au niveau de laquelle les filaments de kératine s'amarrent à la membrane plasmique. Voir hémidesmosome.

Désoxyribonucléique (acide –) Voir ADN.

Diacinèse Stade final de la prophase lors de la première division méiotique ; les chromosomes achèvent de se condenser et la mitose progresse vers la métaphase.

Diacylglycérol Messager second issu de l'hydrolyse du phosphatidylinositol *bis*-phosphate ; il stimule la protéine kinase C.

Dictyostelium discoideum Eucaryote unicellulaire propice à l'étude de la motilité cellulaire et des messagers intracellulaires.

Diffusion facilitée Transport transmembranaire particulier à une espèce moléculaire donnée *via* une protéine membranaire porteuse.

Diploïde Organisme ou cellule pourvue de deux jeux complets de chromosomes.

Diplotène Stade de la première division méiotique où les deux chromosomes de chaque bivalent s'écartent l'un de l'autre tout en restant associés par des chiasmas.

Dolichol (phosphate de –) Grand lipide du réticulum endoplasmique sur lequel la cellule assemble les chaînes oligosaccharidiques destinées à la glycosylation des protéines.

Domaine (d'une protéine) Lobe compact d'une protéine globulaire qui fait partie de sa structure tertiaire.

Domaine basolatéral Zone d'une cellule épithéliale en contact avec ses voisines ou avec la matrice extracellulaire.

Domaine en doigt de gant à zinc Type de domaine de fixation à l'ADN formé de boucles où des résidus cystéine et histidine servent de chélateurs d'ions zinc.

Domaine SH2 Domaine protéique d'environ 100 résidus qui s'attache aux peptides contenant un résidu phosphotyrosine.

Dominant (allèle –) Parmi les deux allèles d'un gène, celui qui détermine le phénotype d'un organisme hétérozygote.

Feuillet β Structure polypeptidique secondaire plane résultant d'un plissement de chaîne étirée dont les replis sont maintenus par des liaisons hydrogène entre résidus siégeant en divers endroits de la chaîne.

Fibroblaste Type de cellule habitant le tissu conjonctif.

Fibronectine Principale protéine d'adhérence de la matrice extracellulaire.

Filament intermédiaire Filament cytosquelettique de 10 nm de diamètre qui consolide les cellules au sein d'un tissu. Voir kératine et neurofilament.

Filopode Fin prolongement de membrane plasmique soutenu par un faisceau d'actine.

Fixation d'azote Réduction biologique d'azote atmosphérique (N_2) en NH_3.

Flagelle Appendice de la membrane plasmique soutenu par des microtubules, qui assure la motilité de la cellule.

Flavine-adénine dinucléotide ($FADH_2$) Coenzyme qui sert de transporteur d'hydrogène et d'électrons dans les réactions d'oxydo-réduction.

Fuseau mitotique Ensemble de microtubules convergeant vers les pôles du fuseau, qui guident les chromosomes fils lors de la mitose. Voir Kinétochore, Microtubules polaires et astraux.

G (protéines ~) Famille de protéines de signalisation asservies à la fixation de nucléotides guanyliques.

G (récepteur couplé aux protéines ~) Récepteur à sept hélices α transmembranaires ; en fixant son ligand, il change de conformation et active une protéine G particulière.

Gène Segment de molécule d'ADN qui code une chaîne polypeptidique ou une molécule d'ARN.

Gène (transfert de ~) Introduction d'ADN étranger dans une cellule. Voir transfection.

Génothèque (banque génomique) Collection de clones de molécules d'ADN représentant la totalité d'un génome.

Génotype Ensemble des potentialités génétiques d'une cellule.

Glucide Molécule de formule brute $(CH_2O)_n$ qui comprend les sucres et leurs polymères.

Gluconéogenèse Voie de synthèse de glucose à partir de précurseurs non glucidiques.

Glycérophospholipides Famille de phospholipides où le glycérol est estérifié par deux chaînes aliphatiques et un groupe phosphoryle portant un groupe polaire.

Glycocalyx Couche riche en oligosaccharides, couvrant la face externe de la membrane plasmique.

Glycogène Long polymère de résidus glucosyle servant de réserve de glucose chez les animaux.

Glycolipide Lipide dont le groupe polaire est constitué de glucides.

Glycolyse Voie de dégradation anaérobie du glucose.

Glycoprotéines Classe de protéines substituées par des groupes glycosyle.

Glycosaminoglycanes (GAG) Longs polysaccharides chargés responsables de la nature gélatineuse de la matrice extracellulaire.

Glycosidique (liaison ~) Liaison covalente entre le carbone carbonyle d'un sucre et le groupe -OH ou $-NH_2$ d'une autre molécule, souvent un autre glucide.

Glycosylation Transfert de résidu glycosyle à une protéine.

Glycosylphosphatidylinositol (ancre ~) (GPI) Glycolipide arrimant certaines protéines à la face externe de la membrane plasmique.

Glyoxylate (cycle du ~) Cycle destiné à transformer en glucides les lipides de réserve des embryons végétaux.

GMP cyclique (GMPc) Guanosine 5'-3'-monophosphate ; important messager second impliqué dans la réponse à diverses hormones et dans la réception lumineuse par les cellules rétiniennes.

GMPc phosphodiestérase Enzyme qui hydrolyse GMPc.

Golgi (appareil de ~) Organite du cytoplasme des cellules d'eucaryote servant à remanier et trier les protéines et les lipides ; dans la cellule végétale, il est aussi le siège de la synthèse des polysaccharides de la paroi.

Gradient électrochimique Différence de concentration d'une substance et des charges électriques nettes entre les liquides baignant les deux faces d'une membrane.

Graisses Voir triacylglycérols

Gras (acides ~) Longue chaînes aliphatiques terminées en général par un groupe carboxyle (COO^-).

Guanine Purine qui s'apparie à la cytosine.

Guanylyl cyclase Enzyme qui catalyse la formation de GMP cyclique à partir de GTP.

Haploïde Cellule ou organisme pourvu d'un seul jeu de chromosomes.

Hélicase Enzyme qui catalyse la détorsion des brins d'ADN.

Hélice α Structure polypeptidique secondaire en spirale de pas droit, stabilisée par des liaisons hydrogène entre le O carbonyle peptidique des résidus $n + 1$ et le H amide peptidique des résidus $n + 4$.

Hémicellulose Polysaccharide qui forme des ponts entre les microfibrilles de cellulose des parois végétales.

Hémidesmosome Zone de contact entre une cellule et la matrice extracellulaire au niveau de laquelle les filaments de kératine sont soudés aux intégrines.

Histones Protéines basiques d'eucaryotes dont l'association à l'ADN garantit le compactage en chromosome.

HMG-14 et HMG-15 Protéines chromosomiques non histones associées à la chromatine décondensée, sujette à la transcription.

Holliday (structure de ~) Intermédiaire clé de la réaction de recombinaison, fait d'une structure cruciforme due à l'appariement de bases entre séquences homologues de molécules d'ADN différentes.

Homéoboîte Motif de 180 pb d'ADN bien conservé qui code des homéodomaines.

Homéodomaine Type de domaine de fixation à l'ADN qu'on retrouve dans les facteurs de transcription qui pilotent l'expression de gènes du développement embryonnaire.

Homéotique (gène ~) Gène dont une mutation transforme une cellule typique d'un tissu donné en une cellule appartenant à un autre tissu.

Homologue (recombinaison ~) Recombinaison entre segments d'ADN portant des séquences nucléotidiques homologues.

Hormone Molécule de signalisation produite par une glande endocrine et qui agit sur les cellules d'un organe éloigné.

Hormone thyroïdienne Hormone synthétisée dans la thyroïde à partir de tyrosine.

Hormones végétales Groupe de petites molécules qui coordonnent la réponse des tissus végétaux aux signaux émis par l'environnement.

Hybridation d'acides nucléiques Association, *via* un appariement de bases, entre deux brins d'ADN ou d'ARN ou entre un brin d'ADN et un brin d'ARN.

Hybridation *in situ* Détection, au moyen d'une sonde radioactive ou fluorescente, d'une séquence d'ADN ou d'ARN donnée dans une préparation de chromosome ou dans une cellule.

Hybridation *in situ* par fluorescence Méthode de repérage de gène par hybridation à une sonde fluorescente.

Hybridation selon Southern Méthode qui utilise des sondes radioactives ou fluorescentes pour retrouver des fragments d'ADN particuliers qui ont été séparés par électrophorèse en gel.

Hybridation à la Western Voir immunoélectrophorèse.

Hydrate de carbone Voir glucide.

Hydrophile Qui possède une affinité envers l'eau.

Hydrophobe Qui tend à éviter le contact de l'eau.

Icosanoïdes Classe de lipides, comprenant les prostaglandines, les prostacyclines, les tromboxanes et les leucotriènes, qui servent de messagers paracrine et autocrine.

Immunoélectrophorèse Méthode qui utilise des anticorps pour retrouver des protéines séparées par électrophorèse dans un gel de polyacrylamide-SDS.

Immunoglobuline Voir anticorps.

Immunoprécipitation Précipitation d'une protéine en solution par son anticorps spécifique.

Inhibition de contact Arrêt de la motilité et de la prolifération des cellules normales à la suite de leur arrivée à la confluence.

Inhibition par rétroaction (rétro-inhibition) Type de régulation allostérique dans lequel le produit d'une voie métabolique inhibe un enzyme intervenant dans la synthèse de ce produit.

Inositol 1,4,5-*tris*phosphate Messager second issu, de l'hydrolyse de PIP2, qui provoque une libération d'ions calcium par le réticulum endoplasmique.

Intégrine Protéine transmembranaire au moyen de laquelle une cellule adhère à la matrice extracellulaire.

Interphase Longue période du cycle cellulaire (comprend les phases G_1, S et G_2) séparant une mitose de la suivante.

Intrinsèque (protéine membranaire ~) Protéine noyée dans la bicouche phospholipidique d'une membrane.

Intron Séquence non codante intercalée entre les exons d'un gène.

Isomérase de disulfures protéiques Enzyme qui catalyse l'interconversion de liaisons disulfure (-S-S-) dans les protéines.

Jonction communicante Tunnel ménagé dans la membrane plasmique de deux cellules juxtaposées et faisant communiquer leur cytoplasme.

Jonction serrée (ou étanche) Réseau continu de brins protéiques cerclant et scellant le pôle apical des cellules d'un épithélium ; elle forme une barrière étanche entre le domaine apical et le domaine basolatéral des cellules épithéliales.

Kératine Type de protéine des filaments intermédiaires des cellules épithéliales.

Kilobase Millier de nucléotides ou de paires de bases nucléotidiques.

Kinase Janus (JAK) Famille de protéine-tyrosine kinases, étrangère aux récepteurs, associées aux récepteurs de cytokines.

Kinésine Moteur moléculaire protéique se déplaçant le long des microtubules pour gagner leur pôle positif.

Kinétochore Structure protéique spécialisée attachée au centromère, qui accroche un chromosome pour le faire glisser le long du fuseau mitotique.

Kinétochore (microtubules du ~) Microtubules du fuseau mitotique arrimés au centromère des chromosomes condensés.

Krebs (cycle de ~) Voir cycle du citrate.

Lame basale Mince trame de matrice extracellulaire soutenant les cellules des épithélium et enrobant les cellules musculaires et adipeuses ainsi que les nerfs périphériques.

Lamellipode Grand appendice lamellaire soutenu par de l'actine, saillant sur la membrane plasmique et servant au déplacement des fibroblastes.

Lamina nucléaire Tissu de filaments de lamine qui soutient la périphérie du noyau.

Lamines Protéines des filaments intermédiaires constituant la lamina nucléaire.

Laminine Principale glycoprotéine d'adhérence de la lame basale.

Leptotène (stade ~) Début de la longue prophase de la première division méiotique au cours duquel les chromosomes s'apparient à leur homologue avant de se condenser.

Leucémie Cancer issu de précurseurs de cellules sanguines circulantes.

Levures Les plus simples parmi les eucaryotes ; modèle préféré dans les recherches sur les eucaryotes.

Phagocytose Processus qui incorpore dans une cellule des particules volumineuses, telles que des bactéries.

Phalloïdine Substance qui se fixe aux filaments d'actine et en empêche le démembrement.

Phase G_0 (du cycle cellulaire) Etat de quiescence d'une cellule dans lequel elle est métaboliquement active sans toutefois se diviser.

Phase G_1 (du cycle cellulaire) Phase du cycle cellulaire allant de la fin d'une mitose au début de la synthèse d'ADN suivante.

Phase G_2 (du cycle cellulaire) Phase du cycle cellulaire allant de la fin d'une phase S au commencement de la mitose.

Phase M Phase mitotique du cycle cellulaire.

Phase S (du cycle cellulaire) Phase du cycle pendant laquelle l'ADN se réplique.

Phénotype Ensemble des caractères visibles d'un organisme.

Phorbol (esters de ~) Classe de promoteurs tumoraux qui, par leur ressemblance avec le diacylglycérol, stimulent la protéine-kinase C.

Phosphatidylinositol 4,5-*bis*phosphate (PIP2) Composant phospholipidique mineur du feuillet interne de la membrane plasmique ; certaines hormones et facteurs de croissance enclenchent son hydrolyse par la phospholipase C, libérant deux messagers seconds, le diacylglycérol et l'inositol *tris*phosphate.

Phosphodiester (liaison ~) Liaison covalente de deux groupes -OH unis à un même atome de phosphore ; c'est le cas entre le groupe phosphoryle 5' d'un nucléotide et l'oxygène 3' du nucléotide adjacent.

Phospholipase C Enzyme qui hydrolyse PIP2 pour former deux messagers second, le diacylglycérol et l'inositol-*tris*phosphate.

Phospholipides Classe de lipides prépondérante dans les biomembranes ; un phospholipide comporte deux chaînes aliphatiques (habituellement d'acide gras) estérifiées à un groupe polaire contenant un groupe phosphoryle.

Phosphorylation Transfert de groupe phosphoryle entre molécules.

Photoréactivation Mécanisme de réparation d'un ADN dans lequel l'énergie solaire sert à rompre les dimères de pyrimidine.

Photosynthèse Processus qui permet à certaines cellules de capter l'énergie solaire pour synthétiser du glucose à partir de CO_2 et d'eau.

Pinocytose Engloutissement non spécifique de gouttelettes de liquide extracellulaire par des vésicules d'endocytose.

Plaques d'adhérence (kinase des ~)(FAK) Tyrosine-protéine kinase, étrangère à la classe des récepteurs, qui joue un rôle clé dans les messages issus des intégrines.

Plaque de signalisation Déterminant reconnu pour la nature tridimensionnelle du reploiement d'une chaîne polypeptidique.

Plasmalogène Famille de phospholipides où une liaison éther remplace une liaison ester.

Plasmide Molécule d'ADN refermée sur elle-même, capable de réplication autonome dans une bactérie hôte.

Plasmodesme Tunnel de communication entre les cytoplasmes de deux cellules végétales contiguës.

Plastides Famille d'organites végétaux qui comprend le chloroplaste, le chromoplaste, le leucoplaste, l'amyloplaste et l'oléoplaste.

Poly-A (queue ~) Fragment d'ADN d'environ 200 nucléotides d'adénine ajouté au bout 3' des ARNm d'eucaryote.

Polyadénylation Processus de synthèse d'une séquence poly-A à l'extrémité d'un pré-ARNm.

Polycistronique (ARNm) ARN messager qui code plusieurs chaînes polypeptidiques.

Polynucléotide Polymère constitué de quelques milliers à quelques millions de nucléotides.

Polype Tumeur bénigne faisant saillie sur un épithélium.

Polypeptide Polymère de résidus d'acide aminé.

Polysaccharide Polymère de résidus de sucre.

Polysome Enfilade de ribosomes traduisant un ARNm.

Pompe à ions Protéine qui couple l'utilisation d'ATP à un transfert d'ions à travers une membrane.

Pompe à Na^+/K^+ Pompe à ions de la membrane plasmique qui exporte Na^+ et importe K^+.

Pore nucléaire (complexe du ~) Grand ensemble ménageant un tunnel de passage à travers l'enveloppe nucléaire.

Postulat central Concept selon lequel l'information génétique passe de l'ADN à l'ARN et de l'ARN à la protéine.

Pré-ARNm Transcrit primaire qui sera remanié en ARNm dans la cellule d'eucaryote.

Pré-ARNr Transcrit primaire destiné à être tronçonné pour donner les ARNr 28S, 18S et 5,8S de la cellule eucaryote.

Pré-ARNt Transcrit primaire découpé pour former les divers ARNt.

Prénylation Transfert d'un type particulier de lipide (groupe prényle) à des résidus cystéinyle C-terminaux d'une chaîne polypeptidique.

Primase ARN polymérase qui synthétise les amorces d'ARN sur lesquelles l'ADN polymérase va synthétiser un brin d'ADN.

Procaryote (cellule de ~) Cellule dépourvue d'enveloppe nucléaire, d'organite cytoplasmique et de cytosquelette (souvent des bactéries).

Progestérone Hormone stéroïde sécrétée par l'ovaire.

Prométaphase Période de transition entre la prophase et la métaphase, durant laquelle les microtubules du fuseau se soudent aux kinétochores et les chromosomes oscillent jusqu'à ce qu'ils atteignent le centre de la cellule.

Promoteur Séquence d'ADN à laquelle se fixe l'ARN polymérase pour amorcer la transcription.

Restriction (carte de ~) Place des sites de clivage d'un ADN par des endonucléases de restriction.

Restriction (endonucléase de ~) Enzyme qui coupe les brins d'ADN en des endroits particuliers.

Restriction (point de ~) Point de régulation du cycle cellulaire animal situé à la fin de G_1 ; une fois ce point franchi, la cellule entre définitivement en phase S et complète un cycle de division.

Réticulum endoplasmique (RE) Vaste réseau de tubules et de sacs membranaires interconnectés servant à la maturation et au tri des protéines ainsi qu'à la synthèse des lipides.

Réticulum endoplasmique lisse Site principal de synthèse de lipides dans la cellule eucaryote.

Réticulum endoplasmique rugueux Région du réticulum endoplasmique couverte de ribosomes et effectuant l'assemblage et la maturation des protéines.

Réticulum sarcoplasmique (RS) Réseau membranaire propre à la cellule musculaire, qui accumule et libère une grande quantité d'ion calcium.

Rétroposon Elément transposable qui se déplace *via* la transcription inverse d'un intermédiaire ARN.

Rétrovirus Virus qui se réplique par transcription inverse, en répliquant son ARN génomique sous forme d'ADN.

Rhodopsine Photorécepteur protéique couplé à G, qui active la transducine après avoir capté un photon.

Ribonucléique (acide ~)(ARN) Polymère de ribonucléotides

Ribosome Particule composée d'ARN et de protéines où s'effectue la synthèse de protéines.

Ribozyme Enzyme constitué d'ARN.

S (phase ~) Phase du cycle cellulaire pendant laquelle l'ADN se réplique.

Sarcome Cancer issu des cellules du tissu conjonctif.

Sarcome de Rous (virus du ~)(RSV) Rétrovirus provoquant un cancer aigu, chez lequel on a identifié le premier oncogène.

Sarcomère Module fonctionnel de la cellule musculaire striée, où l'actine entre en interaction avec la myosine.

Sclérenchyme Ensemble de cellules végétales pourvues d'une épaisse paroi servant de charpente à la plante.

Sélectines Molécules d'adhérence cellulaire qui reconnaissent des oligosaccharides présents à la surface d'une cellule.

Séquence signal Séquence hydrophobe du bout aminé d'une chaîne polpypeptidique, qui la destine, chez les bactéries, à la sécrétion, et chez les eucaryotes au transfert dans la lumière du réticulum endoplasmique.

Shine-Delgarno (séquence de ~) Séquence siégeant en amont du site d'amorçage, qui aligne correctement les ARNm bactériens sur les ribosomes.

Signal de localisation nucléaire Séquence d'acides aminés qui dicte le passage de certaines protéines du cytoplasme au noyau.

Site actif Domaine d'un enzyme qui fixe les substrats et catalyse la réaction enzymatique.

Souches (cellules ~) Voir Cellules souches

Southern (hybridation selon ~) Méthode qui utilise des sondes radioactives ou fluorescentes pour retrouver des fragments d'ADN particuliers qui ont été séparés par électrophorèse en gel.

Spectrine Principale protéine s'attachant à l'actine dans le cortex cellulaire.

Sphingomyéline Phospholipide constitué de deux chaînes aliphatiques liées à un groupe polaire contenant de la choline.

Src Protéine-tyrosine kinase, étrangère à la classe des récepteurs, codée par l'oncogène *src* du génome du virus du sarcome de Rous.

STAT (protéine ~) Facteur de transcription pourvu d'un domaine SH2 ; activé par phosphorylation d'une tyrosine, réaction qui fait passer ce facteur du cytoplasme au noyau.

Stéréocil Microvillosité particulière à l'épithélium acoustique.

Stéroïdes hormonaux (hormones stéroïdes) Groupe d'hormones hydrophobes dérivées du cholestérol.

Structure primaire Séquence d'acides aminés d'une chaîne polypeptidique.

Structure quaternaire Structure due aux interactions entre protomères d'une protéine multimérique.

Structure secondaire Conformation régulière périodique des résidus d'acide aminé de certaines régions des chaînes protéiques. Voir hélice α, feuillet β.

Structure tertiaire Reploiement en forme de globule compact des structures secondaires d'une chaîne polypeptidique, qui confère à la protéine ses capacités physiologiques.

Substrat Molécule sujette à l'action d'un enzyme.

Suppresseur de tumeur (gène ~) Gène dont la destruction induit le développement d'une tumeur.

Symport Transport de deux molécules dans le même sens à travers une membrane.

Synapse Connexion entre un neurone et une autre cellule, où les signaux se transmettent par des neuromédiateurs chimiques.

Synapsis Appariement des chromosomes homologues lors de la mitose.

Synaptonémal (complexe ~) Structure protéique en forme d'échelle présente sur toute la longueur des chromosomes homologues étroitement accolés au début de la méiose (tétrades).

Taxol Médicament qui s'attache aux microtubules et empêche leur renouvellement.

Télomérase Transcriptase inverse qui synthétise les séquences répétitives télomériques du bout des chromosomes en utilisant comme moule son propre ARN.

Télomères Blocs répétitifs de séquence simple qui stabilisent les bouts des chromosomes ouverts.

Télophase Dernière phase de la mitose, pendant laquelle le noyau se reforme et les chromosomes se décondensent.

Testostérone Hormone sécrétée par le testicule.

Thermosensible (mutant ~) Cellule qui exprime une protéine fonctionnant à une température donnée, mais pas à une autre température, alors que la protéine normale (de la cellule sauvage) fonctionne aux deux températures.

Thylacoïde (membrane ~) Membrane siégeant au sein du chloroplaste, où s'effectue le transfert d'électrons et la synthèse d'ATP.

Thymine Pyrimidine qui s'apparie à l'adénine dans l'ADN.

Tirette à leucines Domaine d'une protéine qui, grâce à une série de résidus leucine, s'accouple au domaine semblable d'une autre protéine pour former un dimère ; structure courante dans les facteurs de transcription.

Topo-isomérase Transphosphorylase qui catalyse la coupure et la soudure des brins d'ADN pour permettre leur détorsion ou leur torsion en ce point.

Tumeur bénigne Tumeur qui reste localisée à son site d'origine.

Traduction Synthèse de chaîne polypeptidique sur une matrice d'ARNm.

Traduction *in vitro* Synthèse protéique dans un extrait de cellules.

Transcytose Tri et transport vésiculaire de protéine d'un domaine à l'autre de la membrane plasmique d'une cellule après endocytose.

Transcriptase inverse ADN polymérase qui utilise une matrice d'ARN.

Transcription Synthèse d'une molécule d'ARN sur une matrice d'ADN.

Transcription (facteur de ~) Protéine qui gouverne l'activité de l'ARN polymérase.

Transducine Protéine G qui, activée par la rhodopsine, stimule la GMPc phosphodiestérase.

Transduction de signal Enchaînement de réactions qui transmet à des récepteurs intracellulaires un signal chimique donné parvenu à la surface d'une cellule.

***Trans*-épissage** Union d'exons appartenant à des molécules de pré-ARNm différentes.

Transfection Introduction de gène étranger, sous forme d'ADN nu, dans une cellule d'eucaryote.

Transfert (ARN de ~)(ARNt) Molécule d'ARN servant d'adaptateur entre les acides aminés et les codons d'un ARNm au cours de sa traduction en protéine.

Transgénique (souris ~) Lignée de souris dont on a modifié le génome par introduction d'un gène étranger dans la lignée germinale du fondateur.

Transmembranaire (protéine ~) Protéine membranaire intrinsèque qui traverse la bicouche phospholipidique et déborde sur chacune de ses faces.

Transport passif Flux sélectif de molécules à travers une membrane dans le sens énergétiquement favorable.

Transposition Déplacement d'un segment d'ADN dans le génome.

Transposon Elément d'ADN qui migre çà et là dans le génome.

Triglycérides (graisses) Classe de molécules où le glycérol est estérifié par trois chaînes d'acide gras.

Tropomyosine Protéine fibreuse à laquelle s'attache le filament d'actine et qui gouverne la contraction en s'interposant entre l'actine et la myosine.

Tubuline Protéine du cytosquelette qui se polymérise en microtubules.

Tumeur Masse de cellules due à une prolifération anarchique.

Tumeur maligne Tumeur qui envahit un tissu sain et se disperse dans l'organisme.

Tunnel à ions Protéine transmembranaire ménageant un tunnel aqueux pour le passage des ions à travers une membrane.

Tunnel protéique Protéine transmembranaire ménageant un pore en son sein.

Turgescence (pression de ~) Pression hydrostatique à l'intérieur d'une cellule végétale.

Tyrosine-protéine kinase Voir protéine-tyrosine kinase.

Ubiquinone Voir coenzyme Q.

Ubiquitine Protéine ubiquitaire que la cellule emploie pour marquer les nombreuses protéines qu'elle désire détruire.

Uniport Protéine porteuse transmembranaire qui admet une seule espèce moléculaire.

Uracile Pyrimidine de l'ARN qui s'apparie à l'adénine.

Vacuole Grande enclave cytoplasmique à paroi membraneuse de la cellule eucaryote ; chez la plante, elle accumule des nutriments et des déchets, détruit des macromolécules et maintient la pression hydrostatique.

Vecteur (de clonage) Molécule d'ADN qui, une fois entrée dans une cellule hôte, permet de répliquer un fragment d'ADN cloné.

Vecteur d'expression Vecteur construit pour faire s'exprimer en protéine un fragment d'ADN cloné dans une cellule hôte.

Vésicules sécrétoires Vésicules qui transportent les protéines du Golgi à la surface cellulaire.

Vésicule synaptique Vésicule sécrétoire qui libère un neuromédiateur au niveau d'une synapse.

Vinblastine Médicament qui empêche les microtubules de se polymériser.

Vincristine Médicament qui empêche les microtubules de se polymériser.

Virus tumorigène Virus susceptible de causer l'apparition d'une tumeur chez l'Homme ou l'animal.

***Xenopus laevis* (xénope)** Amphibien anoure utilisé comme modèle d'étude du développement embryonnaire.

Zinc (domaine en doigt de gant à ~) Type de domaine de fixation à l'ADN formé de boucles où des résidus cystéine et histidine servent de chélateur d'ions zinc.

Zygote Œuf fécondé, généralement diploïde.

Zygotène Dernière étape de la méiose I, celle où les chromosomes homologues sont étroitement associés.

Index



Cet ouvrage a pour objectif de présenter les **processus fondamentaux de la vie à l'échelle moléculaire** par une **approche pédagogique rigoureuse** :

- les **divers chapitres** de l'ouvrage s'enchaînent **logiquement**, selon un fil conducteur allant du rappel des notions de biologie classique aux applications de la médecine moderne;
- le caractère concret de l'exposé est mis en lumière par un grand nombre de **schémas pertinents** et de photographies originales;
- des intitulés «**Expérience clé**» et «**Médecine moléculaire**» résumant des expériences-phares soulignent l'essence expérimentale de cette science;
- chaque chapitre se complète par un **résumé** et les **mots-clés** s'y rapportant;
- un **glossaire** reprend les termes introduits un à un dans le texte et un **questionnaire**, avec corrigé, accompagne chacun des chapitres.